

**Eigenschaften rekombinanter *sym*-Homospermidinsynthase und
Desoxyhypusinsynthase aus *Senecio vernalis***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Reiner Harms
aus Norden

1. Referent: Professor Dr. Thomas Hartmann

2. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues

eingereicht am: 19.09.2002

mündliche Prüfung am: 04.12.2002

2003

(Druckjahr)

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor/Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

OBER, D., HARMS, R. und HARTMANN, T. (2000) Cloning and expression of homospermidine synthase from *Senecio vulgaris*: a revision. *Phytochemistry* 55, 305-309

Tagungsbeiträge:

HARMS, R., OBER, D. und HARTMANN, T. (1999) Eigenschaften einer rekombinanten pflanzlichen Homospermidinsynthase. Tagung der Sektion „Pflanzliche Naturstoffe“ der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bonn, 14.-16.05.1999

HARMS, R., OBER, D. und HARTMANN, T. (1999) Mechanism, substrate specificity and kinetics of recombinant plant homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis.

Joint meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), the American Society of Pharmacognosy (ASP), the Association Française pour L'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie (AFERP) and the Phytochemical Society of Europe (PSE), "2000 years of Natural Products Research – Past, Present and Future", Amsterdam, Niederlande, 26. – 30.07.1999

Danksagung

Prof. Dr. Thomas Hartmann danke ich für die Gelegenheit zur Durchführung der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Biologie, für die interessante Themenstellung und die permanente Bereitschaft zur Diskussion und kritischen Betrachtung meiner Arbeit.

Dr. Dietrich Ober danke ich für die Überlassung der rekombinanten Bakterienstämme zur Expression der DHS, HSS und des eIF5A, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können, sowie für manchen guten Tip zur Laborarbeit.

Dank schulde ich dem durch einen tragischen Unglücksfall verstorbenen Dr. Ludger Witte für die Durchführung der GC-MS-Analysen. Seine Arbeit trug in erheblichem Maße dazu bei, dass die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation erfolgreich beendet werden konnten.

Dr. Henning Schmidt, Institut für Genetik der TU Braunschweig, danke ich für die Überlassung des *S. cerevisiae*-Wildstammes.

Claudine Theuring und Loretta Heise danke ich für die Pflege der Wurzelorgankulturen von *S. vernalis* sowie für viele kleine Tips und Leihgaben, die mir die tägliche Laborarbeit erleichterten.

Dr. Gerson Graser danke ich ebenfalls für die Abtretung seines ergiebigen Fundus von Laborzubehör sowie für die Einführung in die Welt der Polyaminquantifizierung.

Erika Christoph und Doris Glindemann danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Meisterung bürokratischer Hürden aller Art.

Dr. Rainer („Raner“) Lindigkeit möchte ich danken für seine wirkungsvollen Einsätze bei der Behebung von Hard- und Softwareproblemen.

Allen anderen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie danke ich für das kollegiale und freundschaftliche Miteinander.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir meine Ausbildung ermöglicht haben.

Nicht zuletzt schulde ich meiner Frau Okka ein großes Dankeschön dafür, dass sie über die gesamte Zeit, in der diese Arbeit entstand, viel Geduld und Verständnis für mich aufgebracht hat.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	PFLANZLICHER SEKUNDÄRSTOFFWECHSEL	1
1.2	PYRROLIZIDINALKALOIDE (PA)	2
1.3	HOMOSPERMIDINSYNTHESE (HSS)	6
1.4	DESOXYHYPUSINSYNTHESE (DHS), eIF5A UND HYPUSIN	8
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
2	MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1	PFLANZENMATERIAL.....	14
2.1.1	Wurzelorgankulturen (WOK) von <i>Senecio vernalis</i>	14
2.1.2	Versuche zum biochemischen Nachweis des eIF5A und der DHS aus WOK von <i>Senecio vernalis</i>	15
2.2	HEFEN	15
2.2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Wildtyp)	15
2.3	BAKTERIELLE EXPRESSION.....	17
2.3.1	Bakterielle Expression rekombinanter Proteine	17
2.3.1	Homospermidin-Synthase aus <i>R. viridis</i> : <i>E. coli</i> BL21 / pHsR _v T ₇ 2.1	17
2.3.2	eIF5A aus <i>N. crassa</i> : <i>E. coli</i> M15[pREP4] [pqz30NC21K]	18
2.3.3	Desoxyhypusinsynthase aus <i>S. vernalis</i> : <i>E. coli</i> BL21 (DE3) I4-2	18
2.3.4	Homospermidinsynthase aus <i>S. vernalis</i> : <i>E. coli</i> BL21 (DE3) B12(3)	18
2.3.5	eIF5A aus <i>S. vernalis</i> : <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pet23b eIFsv1	18
2.4	ULTRASCHALLAUFSCHLUß VON BAKTERIENZELLEN	19
2.5	DERIVATISIERUNGEN, PRÄPARATIONEN UND SYNTHESSEN	19
2.5.1	Qualitative und quantitative Bestimmung der Polyamine	19
2.5.2	Derivatisierung der Polyamine mit Chlorameisensäuremethylester zur GC-MS-Analyse	20
2.5.3	Proteinhydrolyse und Derivatisierung der Aminosäuren für die GC-MS-Analyse zum Hypusin-Nachweis	21
2.5.4	Enzymatische Präparation von Homospermidin mit HSS aus <i>R. viridis</i>	22
2.5.5	Synthese von Canavalmin (1,13-Diamino-5,9-diaza-tridecan) und Norspermin (1,11-Diamino-4,8-diaza-undecan)	23
2.6	METHODEN ZUR BESTIMMUNG ENZYMATISCHER AKTIVITÄT	24
2.6.1	Bestimmung von HSS-Aktivität (Standardansatz)	24
2.6.2	Standardansatz zur Bestimmung von DHS-Aktivität	25
2.7	FLÜSSIGSZINTILLATION	26
2.8	AUTORADIOGRAPHIE	26
2.9	PROTEINREINIGUNG	27
2.9.1	Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen mit PD-10-Säulen	27
2.9.2	Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen	27
2.9.3	Ammoniumsulfat-Präzipitation	28
2.9.4	Reinigung der DHS über ein dreistufiges säulenchromatographisches Verfahren	28
2.9.5	Reinigung der rekombinanten HSS von <i>S. vernalis</i> aus <i>E. coli</i> BL 21	30
2.9.6	Reinigung der rekombinanten eIF5A-Vorläuferproteine von <i>Senecio vernalis</i> und <i>Neurospora crassa</i>	31
2.10	PROTEINBESTIMMUNG	31
2.11	PROTEINSCHNELLFÄLLUNG MIT TCA	32

2.12	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	32
2.13	BLOTTEN VON ELEKTROPHORESEGELEN	34
2.14	COOMASSIE-FÄRBUNG VON SDS-GELEN UND BLOTMEMBRANEN.....	35
2.15	PUFFERSYSTEME.....	36
2.16	CHEMIKALIEN.....	37
2.17	RADIOCHEMIKALIEN	37
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	VORVERSUCHE ZUM BIOCHEMISCHEN NACHWEIS VON EIF5A IN WOK VON <i>SENECIO VERNALIS</i>	38
3.2	ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG EINER METHODE ZUR BESTIMMUNG DER DHS-AKTIVITÄT	39
3.3	ANZUCHT DES <i>E. COLI</i> BL 21 (DE3) PET 23B EIFSV1 UND REINIGUNG DES REKOMBINANTEN EIF5A-VORLÄUFERPROTEINS VON <i>SENECIO VERNALIS</i>	48
3.4	REINIGUNG DER REKOMBINANTEN HSS UND DHS AUS <i>SENECIO VERNALIS</i>	49
3.5	SYNTHESE VON HOMOSPERMIDIN	61
3.6	QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER BENZOYLIERTEN POLYAMINE	62
3.7	DIE PFLANZLICHE HSS VERWENDET PUTRESCIN NICHT ALS AMINOBUTYLDONOR....	64
3.8	ERMITTLUNG DES pH-OPTIMUMS VON DHS UND HSS AUS <i>S. VERNALIS</i>	66
3.9	ERMITTLUNG DER WECHSELZAHL (TURNOVER-NUMBER) DER DHS- UND HSS-KATALYSIERTEN REAKTIONEN.....	67
3.10	HOMOSPERMIDIN IST PRODUKT UND SUBSTRAT VON DHS UND HSS	67
3.11	SUBSTRATSPEZIFITÄT DER DHS UND HSS	74
3.12	IDENTIFIZIERUNG DER REAKTIONSPRODUKTE DURCH GC/MS	79
3.13	SUBSTRATKINETIKEN VON DHS UND HSS	88
3.14	SUBSTRAT-KOMPETITIONSVERSUCHE	95
4	DISKUSSION	102
4.1	ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN VON DHS UND HSS	102
4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBSTRATSPEZIFITÄT VON DHS UND HSS	106
4.3	SUBSTRATKINETIKEN	110
4.4	SUBSTRAT-KOMPETITIONSVERSUCHE	111
4.5	SCHLUSSBETRACHTUNG	112
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	118

Verzeichnis der Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
Cad	Cadaverin (1,5-Diaminopentan)
Can	Canavalmin
Ci	Curie
cpm	Zählimpulse pro Minute
d	Tag
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DHS	Desoxyhypusinsynthase
dSAM	decarboxyliertes S-Adenosylmethionin
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF5A	eukaryontischer Translations-Initiationsfaktor 5A
eIF5v1	eIF5A von <i>S. vernalis</i>
Fa.	Firma
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdanziehungskraft
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
Hspd	<i>sym</i> -Homospermidin
HSS	<i>sym</i> -Homospermidinsynthase
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
kat	katal: Maß für enzymatische Aktivität (1 kat = 1 mol / s)
K _i	Hemmkonstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
2-ME	2-Mercaptoethanol
MG	Molekulargewicht (g / mol)

IV

MS	Massenspektrometrie
MTA	Methylthioadenosin
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH+H ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
PA	Pyrrolizidinalkaloide
Put	Putrescin
<i>R. viridis</i>	<i>Rhodopseudomonas viridis</i>
RI	Retentionsindex
<i>S. vernalis</i>	<i>Senecio vernalis</i>
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SAMDC	SAM-Decarboxylase
SDS	Sodium-dodecylsulphate (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Spd	Spermidin
spez. Akt.	spezifische Aktivität
Spm	Spermin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbares Licht
WOK	Wurzelorgankultur

1 Einleitung

1.1 Pflanzlicher Sekundärstoffwechsel

Seit frühester Zeit machten sich Menschen die Heilkraft von Arzneipflanzen zunutze, deren Auswahl und Anwendung größtenteils auf empirischem Wissen beruhte. Im Verlauf der Entwicklung der modernen Naturwissenschaften, besonders der Chemie, Biochemie und Biologie konnten aus vielen Pflanzen die wirksamen Verbindungen isoliert und ihre Strukturen aufgeklärt werden. Biochemische Untersuchungen führten zur Aufklärung der Stoffwechselwege z. B. durch Fütterung radioaktiv markierter Substrate und Identifizierung der daraus in der Pflanze entstandenen Produkte. Es konnten dabei zwei Gruppen von Stoffwechselprodukten ausgemacht werden: Auf der einen Seite die Produkte des primären Stoffwechsels, die einem sehr hohen Um- und Abbau unterliegen, die ubiquitär vorkommen und für Wachstum und Entwicklung der Pflanze essentiell sind, zum Beispiel Proteine, Fette und Kohlenhydrate. Auf der anderen Seite die pflanzlichen Sekundärstoffe, zu denen auch die arzneilich wirksamen Substanzen zählen, deren Vorkommen oft auf bestimmte Pflanzen beschränkt ist. Diese Substanzen unterliegen oft keinem weiteren Abbau, einmal gebildet, werden sie stabil in der Pflanze gespeichert. Zu dieser Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zählt man z. B. Gerbstoffe, ätherische Öle und viele Alkaloide. Je nach chemischer Beschaffenheit der jeweiligen Sekundärstoffe findet ihre Speicherung in hydrophilen Kompartimenten (Vakuolen) oder lipophilen Kompartimenten wie zum Beispiel Drüsenhaaren, Exkretgängen oder Ölbehältern statt (HARTMANN, 1996). Durch die erwähnten Tracer-Experimente mit markierten Substraten konnten Produkte des Primärstoffwechsels als Vorstufen des sekundären Stoffwechsels identifiziert werden. Im Gegensatz zum Primärstoffwechsel ist der Sekundärstoffwechsel nicht essentiell für Wachstum und Entwicklung der Pflanze, weshalb man die Sekundärstoffe zunächst als zufällig entstandene Stoffe ansah, oder sogar als Abfallprodukte, die im pflanzlichen Gewebe akkumulieren, aber keinen weiteren Nutzen für die Pflanze haben (MOTHES, 1955; HASLAM, 1986; LUCKNER, 1990). Heute wird die Meinung vertreten, dass die akkumulierten Sekundärstoffe wichtige ökologische Funktionen erfüllen (HARBORNE, 1993). Als chemische Schutzstoffe der Pflanze sichern sie deren Überleben in der Umwelt (SWAIN, 1977; BOPPRE, 1986). Untersuchungen an Chinolizidinalkaloid-

produzierenden Pflanzen wie zum Beispiel den Lupinen ergaben, daß der Pflanze aus der Produktion von Alkaloiden, also Sekundärstoffen, ein Vorteil erwächst: Pflanzenfresser wie zum Beispiel Kaninchen bevorzugen als Nahrung die alkaloidarmen Pflanzen (Süßlupinen), während sie die bitterschmeckenden alkaloidhaltigen Pflanzen (Bitterlupinen) verschmähen (WINK, 1987). Da Pflanzen ortsgebundene Organismen sind und nicht vor ihren Fraßfeinden davonlaufen können, war es für sie im Verlauf der Evolution überlebensnotwendig, Schutzmechanismen zur Abwehr ihrer Feinde zu entwickeln, zum Beispiel derbe ledrige Blätter, Dornen und Stacheln sowie Inhaltsstoffe, die Fraßfeinde abschrecken sollen. Im Verlauf der Coevolution von Pflanzen und herbivoren Insekten haben es verschiedene Insekten gelernt, die chemische Abwehr der Pflanze zu überwinden, zum Beispiel dadurch, daß sie toxische Abwehrstoffe entgiften oder metabolisieren und speichern. Diese Speicherung schützt sie selber vor Fraßfeinden (HARTMANN, 1999). All diese Aspekte sind Indizien dafür, daß pflanzlicher Sekundärstoffwechsel nicht einfach aus einer „Laune der Natur“ heraus entstanden ist, sondern für die Pflanze eine Notwendigkeit darstellt, ohne die sie sich als Art und Individuum nicht im evolutiven Wettstreit behaupten kann.

1.2 Pyrrolizidinalkaloide (PA)

In unserem Arbeitskreis untersuchen wir Pflanzen, die Pyrrolizidinalkaloide (PA) produzieren, eine Gruppe von Alkaloiden, die in verschiedenen Familien des Pflanzenreiches vorkommen. Bis heute sind über 370 Strukturen in 560 Arten gefunden worden (HARTMANN und WITTE, 1995, HARTMANN und OBER, 2000, s. Tabelle 1.1). Bei den PA handelt es sich um Esteralkaloide, die aus einer Necin-Base bestehen, an die eine oder zwei Necin-Säuren gebunden sind, so daß entweder offenkettige Mono- oder Diester oder aber makrozyklische Diester entstehen. Insgesamt lassen sich alle Pyrrolizidinalkaloide fünf verschiedenen Grundstrukturen zuordnen (s. Abbildung 1.1). In der Pflanze liegen sie in Form ihrer wasserlöslichen N-Oxide vor und können somit in der Vakuole der Zelle gespeichert werden (HARTMANN und TOPPEL, 1987, EHMKE et al., 1987). Unter den Alkaloiden besitzen solche mit einer 1,2-Doppelbindung Bedeutung in toxikologischer Hinsicht, denn vielfach ist es durch Aufnahme PA-haltiger Pflanzen zu Vergiftungen und

Todesfällen bei Weidevieh gekommen (ROITMAN, 1983; CULVENOR, 1985), aber auch bei Menschen (MATTOCKS, 1985; DANNINGER et al., 1983). Obwohl das Vieh PA-haltige Pflanzen im allgemeinen wegen des bitteren Geschmacks verschmäht, weicht es bei Nahrungsverknappung auch auf dieses Futter aus. Neben den akuten Auswirkungen der PA (Leberversagen) haben sie auch ein genotoxisches (auf Insekten) (FREI et al., 1992) und karzinogenes Potential. Die PA-N-oxide sind zunächst Prätoxine. Sie werden durch Darmbakterien zu den tertiären Alkaloiden reduziert, passiv resorbiert und in der Leber durch mikrosomale P-450-Monooxygenasen zu karzinogenen Pyrroliderivaten oxidiert (WINTER und SEGALL, 1989).

Verbreitetes Vorkommen von PA	
Familien	Gattungen
Asteraceae	(<i>Senecio</i> , <i>Eupatorium</i> u.a.)
Apocynaceae	(<i>Parsonsia</i> , <i>Anodendron</i> u.a.)
Boraginaceae	(<i>Cynoglossum</i> , <i>Heliotropium</i> , <i>Symphytum</i> u.a.)
Orchidaceae	(<i>Phalaenopsis</i> , <i>Liparis</i> u.a.)
Fabaceae	(<i>Crotalaria</i> , <i>Adenocarpus</i> u.a.)
sporad. Vorkommen von PA	
Familien	Gattungen
Convolvulaceae	(<i>Ipomoea</i>)
Santalaceae	(<i>Thesium</i>)
Celastraceae	(<i>Bhesa</i>)
Ranunculaceae	(<i>Caltha</i>)

Tab. 1.1 Vorkommen von Pyrrolizidinalkaloiden in verschiedenen Pflanzenfamilien

Die PA leiten sich von Stoffwechselprodukten des Aminosäurestoffwechsels ab. Die Necinbase leitet sich von Arginin ab, das über Putrescin und Spermidin in die Alkaloide eingebaut wird (HARTMANN et al., 1988) (Abb. 1.2). Durch Fütterungsversuche mit ^{13}C - und ^{14}C -markierten Vorstufen konnte das seltene Polyamin Homospermidin (Hspd) als erstes spezifisches Intermediat der PA-Biosynthese identifiziert werden (KHAN, ROBINS, 1981, 1985). Es stellt das Kohlenstoffgrundgerüst der Necin-Base der Pyrrolizidinalkaloide dar. Die Necin-Säuren entstammen ebenfalls dem Aminosäurestoffwechsel (CROUT et al., 1972).

Homospermidin (N-(4-aminobutyl)-1,4-diaminobutan) kommt in verschiedenen Bakterien vor, vor allem in der α_2 -Subklasse der Proteobakterien, zu denen *Rhodopseudomonas*, *Nitrobacter*, *Agrobacterium* und *Rhizobium* gehören (BUSSE und AULING, 1988; HAMANA und MATSUZAKI, 1992). Bei höheren Organismen konnte Homospermidin sowohl in Tieren (Hamster) (MATSUZAKI et al, 1982) als auch bei Pflanzen (KUTTAN et al., 1971, SMITH, 1977) nachgewiesen werden.

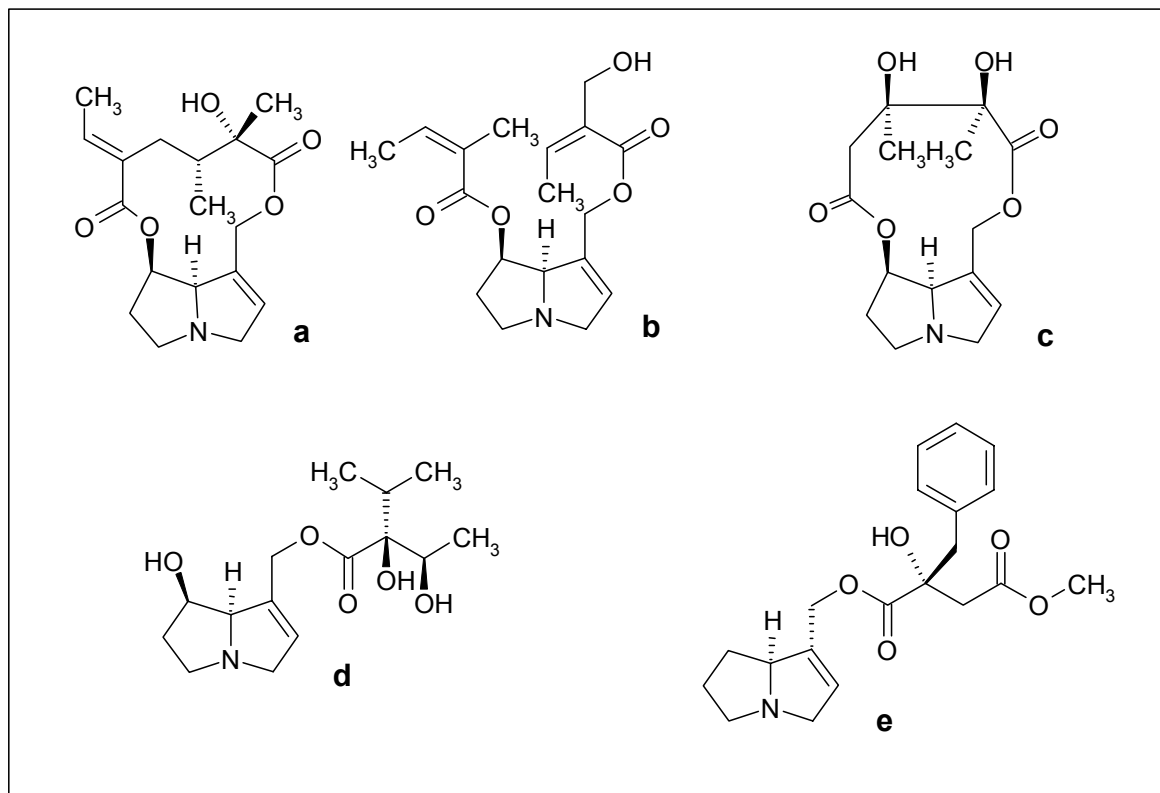


Abb. 1.1 Die fünf Grundstrukturen der Pyrrolizidinalkaloide: a: Senecionin-Typ, b: Triangularin-Typ, c: Monocrotalin-Typ, d: Lycopsamin-Typ, e: Phalaenopsin-Typ

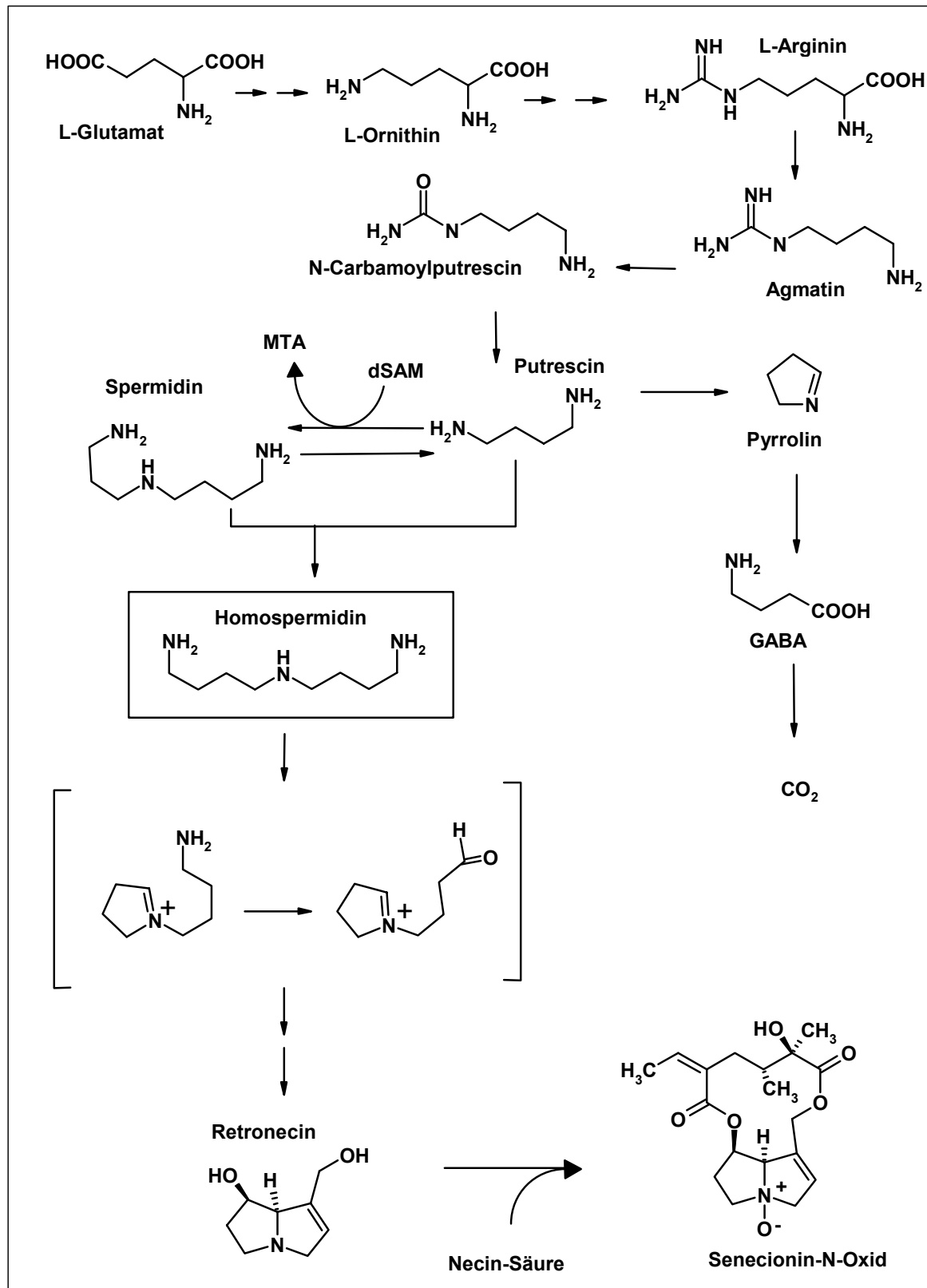


Abb. 1.2 Schema des Polyaminstoffwechsels und der PA-Biosynthese in Asteraceen-Wurzelkulturen; dSAM: decarboxyliertes S-Adenosylmethionin, MTA: Methylthioadenosin, GABA: γ -Aminobuttersäure

1.3 Homospermidinsynthase (HSS)

Die Homospermidinsynthase (HSS) ist das Schlüsselenzym der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese. Zu Beginn dieser Arbeit wurde ihre Funktion wie folgt beschrieben: Die HSS katalysiert in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion die Bildung von Homospermidin aus Putrescin und Spermidin durch Übertragung eines Aminobutylrests auf ein Mol Putrescin (Abb. 1.3). Die zu übertragende Aminobutyleinheit kann alternativ von Putrescin oder Spermidin geliefert werden (BÖTTCHER et al., 1994). Das entstandene Homospermidin wird vollständig in die Pyrrolizidinalkaloide eingebaut und unterliegt keinem Abbau (BÖTTCHER et al. 1993). Somit nimmt die HSS eine zentrale Position zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel ein (Abb.1.4) und hat eine wichtige regulatorische Funktion für die Produktion dieser pflanzlichen Sekundärstoffe. Der erste Nachweis einer Homospermidinsynthase gelang TAIT (1979) aus dem photosynthetisch aktiven Purpurbakterium *Rhodospseudomonas viridis*, die erste pflanzliche HSS wiesen SRIVENUGOPAL und ADIGA (1980) in *Lathyrus sativus* nach, BÖTTCHER (1994) konnte erstmals in verschiedenen PA-bildenden Asteraceen, u. a. in der Gattung *Senecio*, HSS-Aktivität feststellen. Ein molekularer Sequenzvergleich von bakterieller HSS und der pflanzlichen HSS aus *Senecio vernalis* zeigte, dass beide Enzyme phylogenetisch nicht miteinander verwandt sind (THOLL et al., 1996; OBER und HARTMANN, 1999b).

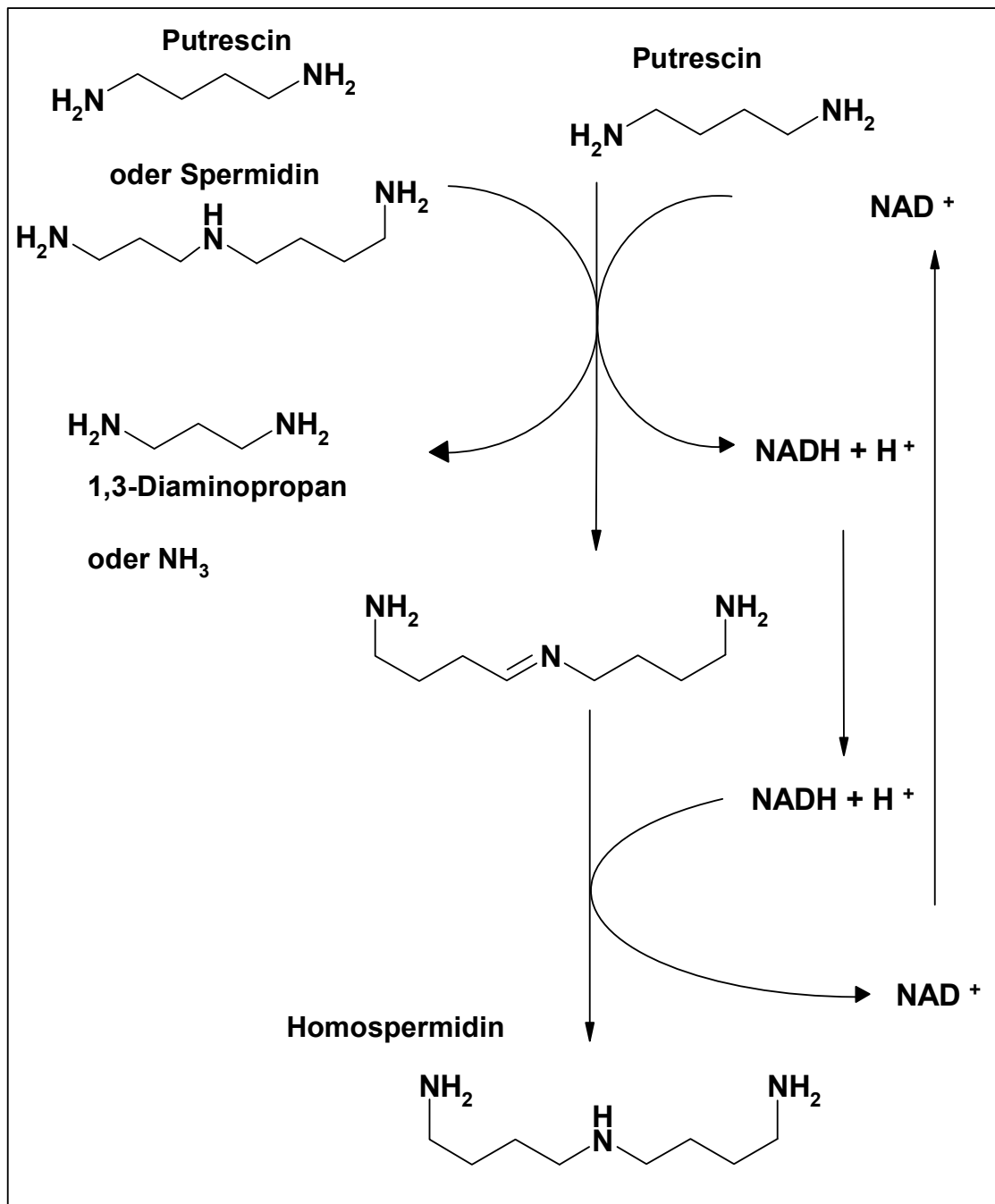


Abb. 1.3 Postulierter Reaktionsmechanismus der Homospermidinsynthese (HSS)

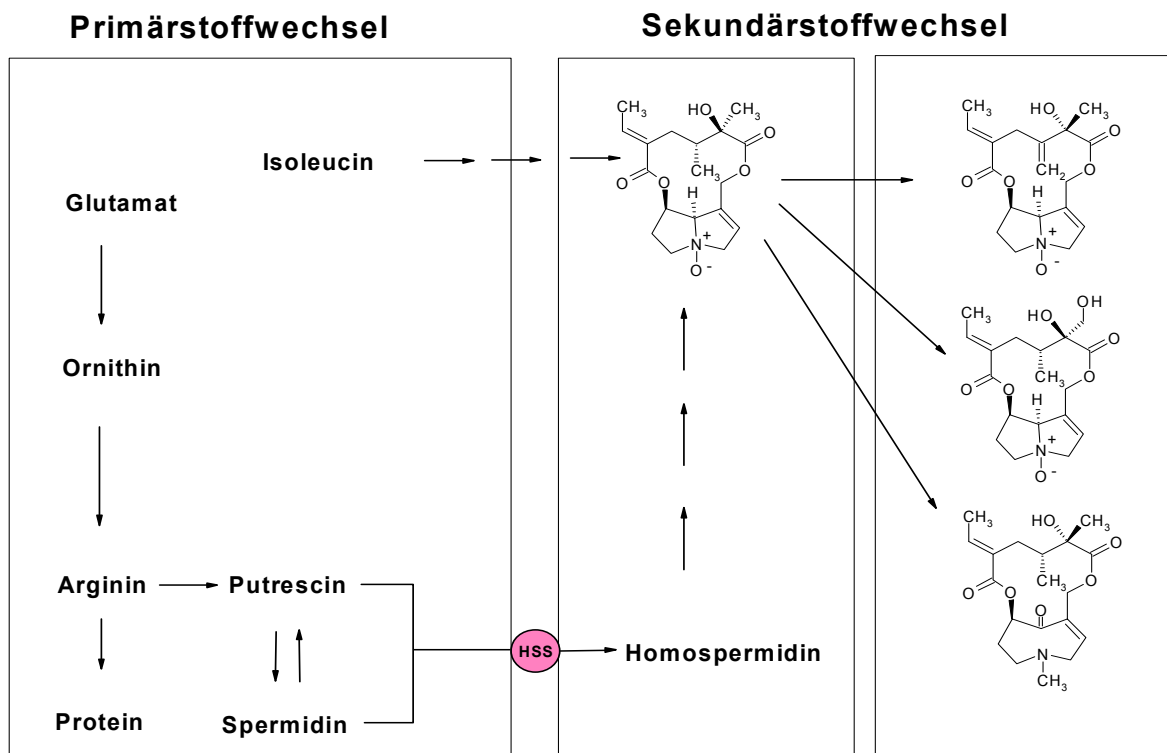


Abb. 1.4 Position der Homospermidinsynthase (HSS) zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. Enzyme des Primärstoffwechsels stellen die Polyamine bereit, aus denen die HSS Homospermidin synthetisiert. Die Enzyme des Sekundärstoffwechsels stellen aus Homospermidin die Necinbase der PA her, die mit der jeweiligen Necinsäure zum Esteralkaloid, hier repräsentiert durch Senecionin-N-oxid (Mitte, oben), verknüpft werden. Die PA, hier dargestellt durch die Alkaloide Seneciphyllin-N-oxid, Retrorsin-N-oxid und Senkirkin (rechts, von oben nach unten), unterliegen einer Diversifizierung durch weitere Enzyme des Sekundärstoffwechsels.

1.4 Desoxyhypusinsynthase (DHS), eIF5A und Hypusin

Die HSS aus *Senecio vernalis* wurde von OBER (1997) bis zur gelelektrophoretischen Homogenität gereinigt und ansequenziert. Ein Proteindatenbank-Abgleich der erhaltenen Aminosäuresequenzen zeigte hohe Übereinstimmungen mit den Proteinsequenzen der Desoxyhypusinsynthase (DHS), eines Enzyms des Primärstoffwechsels. Funktion der DHS ist es, ein Protein, den eukaryontischen Translations-Initiationsfaktor 5A (eIF5A) in einer NAD⁺-abhängigen Reaktion posttranslational zu modifizieren, durch den Transfer einer

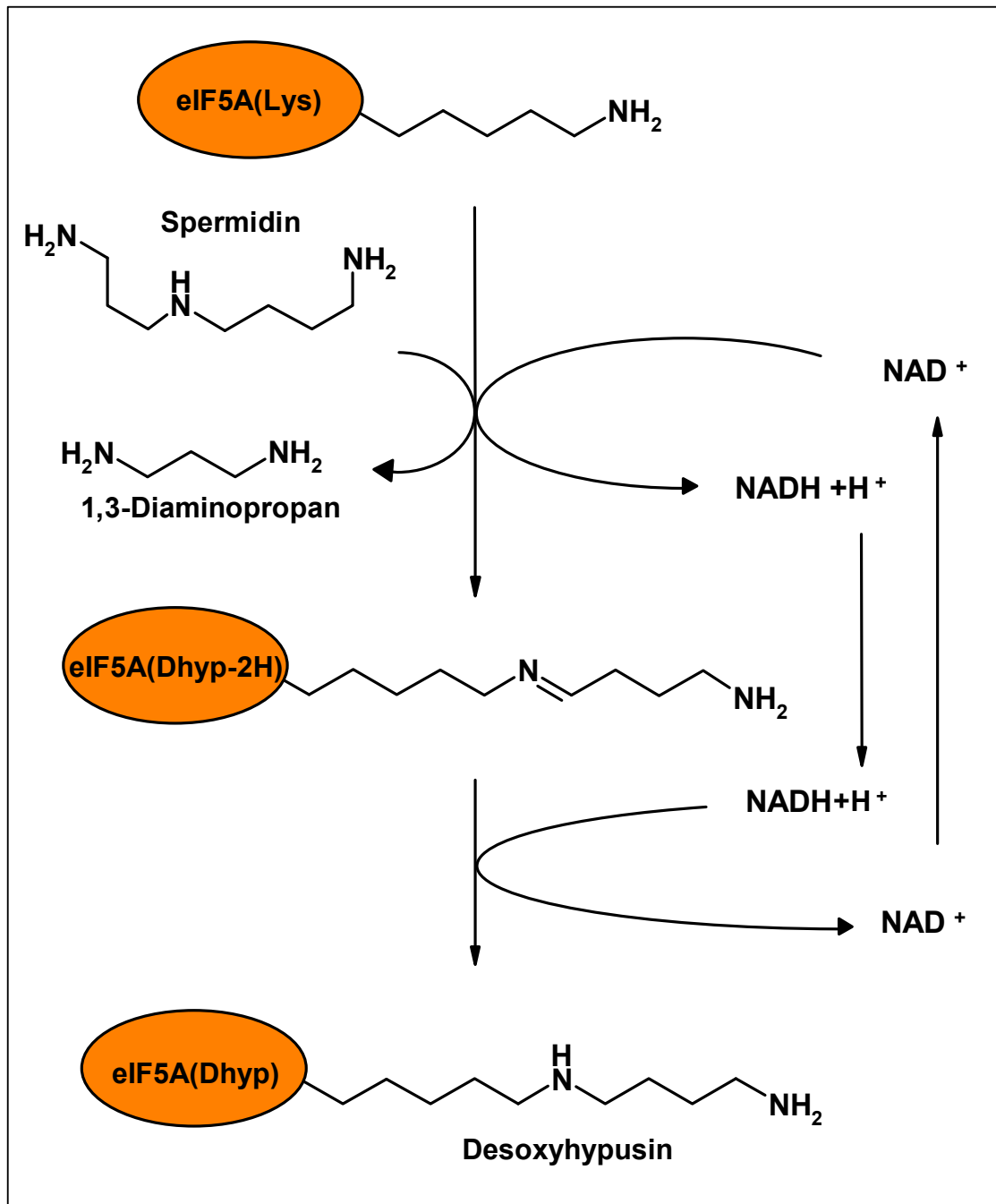


Abb. 1.5 Postulierter Reaktionsmechanismus der Desoxyhypusinsynthase (DHS)

Aminobutylgruppe aus Spermidin auf einen Lysinrest des eIF5A-Vorläuferproteins (Abb. 1.5). Im Anschluß an diese Modifikation erfährt der aminobutylierte Lysinrest noch eine Hydroxylierung in Position 9 (s. Formeln in Abb. 1.6) durch die Desoxyhypusinhydroxylase. Die Funktion des aktiven eIF5A ist bisher nicht einwandfrei geklärt, jedoch ist sie für das Wachstum des Organismus essentiell (SASAKI et al., 1996). Neben dieser essentiellen Hauptaktivität besitzt die DHS auch

eine HSS-Nebenaktivität (OBER und HARTMANN, 1999b). Im Laufe weiterer Untersuchungen gelang in unserem Arbeitskreis die Klonierung und Expression beider Enzyme und des eIF5A aus der Asteracee *Senecio vernalis*, dem Frühlingsgriesskraut (OBER und HARTMANN, 1999b), sowie der DHS und des eIF5A aus Tabak (OBER und HARTMANN, 1999a).

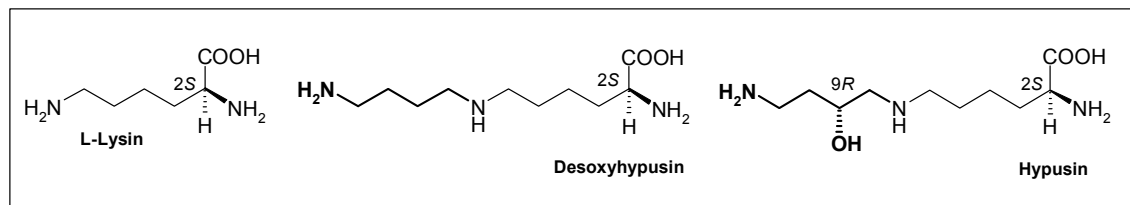


Abb. 1.6 Strukturformeln der Aminosäuren L-Lysin, Desoxyhypusinsäure und Hypusinsäure

Hypusinsäure (N^{ϵ} -(4-Amino-2R-hydroxybutyl)lysin) ist eine seltene stark basische Aminosäure, die von SHIBA et al. (1971) erstmalig aus einem Rinderhirnextrakt isoliert und identifiziert wurde (Abb. 1.6). Die korrekte Stereochemie dieser Substanz wurde durch Synthese und anschließenden Strukturvergleich als (2S,9R)-2,11-diamino-9-hydroxy-7-azaundecansäure bewiesen (SHIBA et al. 1982, TICE und GANEM, 1983.). Da das Molekül formal aus Hydroxyputrescin und Lysin besteht, schlugen SHIBA et al. (1971) dafür den Namen Hypusinsäure vor. Als freie Aminosäure ist sie in allen tierischen Geweben zu finden, konnte jedoch als Bestandteil von Proteinen bisher erst im eIF5A nachgewiesen werden. (COOPER et al., 1983). Es ist wahrscheinlich, daß das gesamte freie Hypusinsäure aus dem Abbau des eIF5A stammt, zumal es keinerlei Hinweise auf einen Biosyntheseweg der freien Aminosäure gibt (PARK et al., 1996).

Der eukaryontische Initiationsfaktor 5A (eIF5A, früher eIF4D bezeichnet) ist ein ca. 16-21 kDa großes Protein, das in allen Eukaryonten und in Archaeobakterien vorkommt und hochkonserviert ist. Es ist das einzige bekannte Protein, welches die seltene Aminosäure Hypusinsäure (s. Abb. 1.6) enthält (PARK et al. 1996). COOPER et al. (1983) konnten den Hypusinsäuregehalt des Proteins auf 1 mol pro mol Protein bestimmen. In vielen Organismen konnte durch Fütterung radioaktiv markierten Putrescins oder Spermidins eine Markierung im eIF5A oder nach Hydrolyse im

Hypusin nachgewiesen werden (COOPER et al., 1982, PARK et al., 1982, CHEN, 1983, TORRELIO et al., 1984, GERNER et al., 1986). Dass der modifizierte Faktor eine zentrale Funktion im Stoffwechsel eukaryontischer Organismen spielt ist unbestritten: Sowohl die Verringerung der eIF5A-Vorläuferproteinkonzentration in Zellen durch Ausschaltung der eIF5A-Gene als auch die Blockade der Spermidin-Bildung hatte in allen Fällen dramatische Auswirkung auf Wachstum und Entwicklung der Zellen. Für Hefezellen ist die Ausschaltung der beiden Gene TIF5A1 und TIF5B1 tödlich (SASAKI et al. 1996). HANAUSKE-ABEL et al. (1994) konnten durch Einsatz von Inhibitoren der Deoxyhypusinhydroxylase eine Hemmung des Zellwachstums am G1/S-Übergang feststellen. CHEN et al. (1996) stellten eine erhöhte Fähigkeit zur Zelldifferenzierung bei murinen Neuroblastomzellen fest, wenn die Desoxyhypusinbildung durch N¹-guanyl-1,7-diaminoheptan gehemmt wurde, woraus sie folgerten, daß Desoxyhypusinbildung und Grad der Zelldifferenzierung negativ miteinander korreliert sind. Wenngleich heute bezweifelt wird, daß der modifizierte eIF5A für die Einleitung der Translation aller Proteine in der Zelle verantwortlich ist (Ausschaltung der eIF5A-Gene in Hefe führt zu Zellwachstumshemmung, jedoch nur zur Hemmung der Proteinbiosynthese um 30% (KANG und HERSHEY, 1994), so wird die Beteiligung des Faktors an der Expression bestimmter Gene diskutiert, die beim Fortschreiten des Zellzyklus eine Rolle spielen (PARK et al., 1993a, b). In Pflanzen wurde das eIF5A erstmals in *Medicago sativa*, der Luzerne, entdeckt (PAY et al., 1991). In *Nicotiana tabacum*-Zellkulturen konnte ein 18 kDa großes Protein durch Fütterung von [³H]Spermidin radioaktiv markiert werden, ohne jedoch Hypusin eindeutig nachweisen zu können (APELBAUM et al., 1988). Der Nachweis gelang CHAMOT und KUHLEMEIER (1992) durch differentielle Expression der eIF5A-Gene aus *Nicotiana plumbaginifolia* in *E. coli*. MEHTA et al. (1991) entdeckten ein 18 kDa-Protein in *Oryza sativa*-Zellsuspensionskulturen, welches sie später als eIF5A identifizieren konnten (MEHTA et al., 1994). In unserem Arbeitskreis konnten OBER und HARTMANN (1999a, b) den eIF5A aus *Nicotiana tabacum* und *Senecio vernalis* und ausgehend von DNA-Sequenzen von *Homo sapiens*, *Methanococcus jannaschii*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* die DHS aus *N. tabacum* und *S. vernalis* klonieren und in *Escherichia coli* exprimieren. Der Faktor aus *S. vernalis* und jener aus *N. tabacum* wiesen eine Homologie auf der Ebene der Aminosäuren von 91% auf. In allen eIF5A war die Aminosäuresequenz von 12 Aminosäuren rund um das modifizierte Lysin konserviert (Ser-Thr-Ser-Lys-Thr-Gly-Hpu*-His-Gly-His-Ala-

Lys), was dafür spricht, daß dieser Bereich unbedingt für eine Funktion des Faktors erforderlich ist. Röntgenstrukturanalysen am eIF5A aus *Methanococcus jannaschii*, einem Archaeobakterium, zeigen, daß diese hochkonservierte Sequenz eine aus dem Proteinmolekül herausragende Schleife bildet, die offensichtlich genau in das aktive Zentrum der DHS hineinragen kann, wobei Wechselwirkungen an der Oberfläche eine weitere entscheidende Rolle spielen (KIM et al., 1998). JOE et al. (1994) konnten einen Kernbereich von 50 Aminosäuren ausmachen (Phe³⁰-Asp⁸⁰), die das Vorläuferprotein unbedingt benötigt, um als Substrat von der DHS gebunden zu werden. Auch dieser Bereich ist hochkonserviert, wenn man die eIF5A verschiedener eukaryontischer Spezies miteinander vergleicht. Experimente mit der DHS aus *S. cerevisiae* zeigten, daß der Hefefaktor auch durch den Faktor aus *N. crassa* oder den menschlichen Faktor ersetzt werden kann. Die folgende Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die Austauschbarkeit der verschiedenen eIF5A-Vorläuferproteine für verschiedene DHS.

eIF5A-Vorläuferprotein aus	Mensch	DHS aus	
		Ratte	Hefe
Mensch	Natürliches Substrat	4	5,6,7
CHO-Zellen	1	5	5
Hefe	2	5	natürliches Substrat
<i>Neurospora crassa</i>	3	---	---
<i>Dictyostelium discoideum</i>	---	---	6
<i>Medicago sativa</i>	---	---	6
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	---	---	keine Modifikation 6

Tab. 1.2 Austauschbarkeit des eIF5A-Vorläuferproteins als Substrat für die DHS verschiedener Organismen (nach OBER, 1997) die Quellen sind durch Indices gekennzeichnet. --- = keine Angaben

1. JOE et al. (1995)

2. SCHNIER et al. (1991)

3. YAN et al. (1996)

4. WOLFF et al. (1995)

5. KANG et al. (1995)

6. MAGDOLEN (1994)

7. SCHWELBERGER et al. (1993)

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Es konnte gezeigt werden, dass sich DHS und HSS aus *S. vernalis* sehr ähnlich sind (Homologie auf Aminosäureebene: 79%, auf Nucleinsäureebene: 83%), so daß Grund zu der Annahme besteht, daß im Laufe der Evolution in PA-produzierenden Pflanzenfamilien durch Genduplikation eine zweite DHS entstanden ist, die ihre ursprüngliche Fähigkeit den eIF5A zu modifizieren, verloren hat und stattdessen in der Lage ist, Homospermidin zu bilden und damit zur Homospermidinsynthese wurde. In Versuchen mit rekombinanter DHS und HSS konnte gezeigt werden, daß die DHS auch die HSS-Reaktion ausführen kann, während die HSS nicht zur Modifikation des eIF5A-Vorläuferproteins in der Lage ist. Dies wäre ein Hinweis darauf, daß ein Enzym des Primärstoffwechsels unter permanentem Selektionsdruck durch Pflanzenfresser (Mikroorganismen, Insekten oder Wirbeltiere) eine neue Aufgabe übernommen hat, nämlich die Produktion von Vorstufen toxischer Alkaloide, die die Pflanze vor Fraßfeinden schützen. Im Zuge der Optimierung der Alkaloidproduktion ist die Fähigkeit, die ursprüngliche Aufgabe zu erfüllen, nämlich die Modifikation des Faktors, verloren gegangen (OBER, HARTMANN, 1999 b). Die große Übereinstimmung der molekularen Eigenschaften beider rekombinanten Enzyme (Homotetramere von je 40-42 kDa Größe, gleiche Substrate und Cosubstrate, ähnliche Reaktionsmechanismen) (OBER und HARTMANN, 1999 b), ließ auch große Übereinstimmung der biochemischen Eigenschaften der Enzyme erwarten. Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, in welchem Maß sich die allgemeinen und kinetischen Eigenschaften von DHS und der aus ihr hervorgegangenen HSS unterscheiden bzw. übereinstimmen. Vor allem folgende Eigenschaften sollten genauer untersucht werden:

- Die Substratspezifität: Da beide Enzyme die HSS-Reaktion katalysieren können, war es interessant, zu erfahren, welche Substrate von ihnen akzeptiert werden.
- Identifizierung der Reaktionsprodukte mit GC-MS
- Kinetische Untersuchungen: Vor allem sollten die K_M -Werte für die Substrate Putrescin und Spermidin und das eIF5A-Vorläuferprotein ermittelt werden. Zusätzlich sollten Hemmstoffversuche durchgeführt werden.
- Alle Untersuchungen sollten am bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigten Enzym durchgeführt werden

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Wurzelorgankulturen (WOK) von *Senecio vernalis*

Die für diese Arbeit verwendeten WOK waren bereits von C. Theuring vor 10 Jahren an unserem Institut angelegt worden und standen für Versuche zur Verfügung.

Das verwendete Flüssigmedium zur Anzucht der Wurzeln nach MURASHIGE und SKOOG (1962) hatte folgende Zusammensetzung:

Murashige und Skoog-Medium ohne Hormon (MSOH):

NH₄NO₃: 1,65 g/l, KNO₃: 1,9 g/l, CaCl₂·2 H₂O: 440 mg/l, MgSO₄·2 H₂O: 370 mg/l, KH₂PO₄: 170 mg/l, Saccharose: 30 g/l, Na-Fe-EDTA: 40 mg/l, Myo-Inositol: 100 mg/l, PM₆-Stammlösung: 1 ml/l, Spurenelemente-Stammlösung: 1 ml/l, KI-Stammlösung: 1 ml/l,
pH-Wert 5,8

PM₆-Stammlösung:

Nicotinsäure: 1 g/l, Thiamin-HCl: 10 g/l, Pyridoxin-HCl: 1 g/l, Mesoinositol: 100 g/l

Kaliumiodid-Stammlösung:

KI: 750 mg/l

Spurenelemente-Stammlösung:

H₃BO₃: 6,2 g/l, MnSO₄·H₂O: 10 g/l, ZnSO₄·7 H₂O: 8,6g/l, NaMoO₄·2 H₂O: 250 mg/l, CuSO₄·5 H₂O: 25 mg/l, CoCl₂·6 H₂O: 25 mg/l

Die Kulturen wurden in 250 ml Weithals-Erlenmeyerkolben mit je 75 ml MSOH-Medium, die mit Aluminiumfolie verschlossen waren, unter sterilen Bedingungen angezogen. Inkubiert wurde in einem Dunkelkulturraum bei 25°C auf Rundschüttlern (100 Upm). Um ständig neues Wurzelmaterial zur Verfügung zu haben, wurde ein

Teil der neu gebildeten Wurzeln (pro Kolben ca. 100 mg) alle 14 Tage in frisches Medium überführt.

2.1.2 Versuche zum biochemischen Nachweis des eIF5A und der DHS aus WOK von *Senecio vernalis*

Zur Detektion des eIF5A-Vorläuferproteins in *Senecio vernalis* wurde [^{14}C]Spermidin an Wurzelkulturen verfüttert, um radioaktiv markiertes eIF5A empfindlich nachweisen zu können. Ca 0,5 g neugebildetes Wurzelmaterial wurde in einem 25 ml Erlenmeyerkolben mit 5 ml frischem MSOH-Medium und 2 μCi [^{14}C]Spermidin (Endkonzentration im Medium: 10 μM) über 48 Stunden unter Standardbedingungen (25°C, 120 Upm, Dunkelkultur) inkubiert. Zu festgelegten Zeiten wurden 10 μl -Proben aus dem Medium gezogen und im Szintillationszähler vermessen (2.7), um die Aufnahme des ^{14}C -Tracers in die Wurzeln zu überprüfen. Die Wurzeln wurden mit Wasser abgespült und mit Zellstoff abgetrocknet, mit flüssigem Stickstoff übergossen und in einem Mörser mit 3 ml PBS-Puffer (2.15) zerkleinert. Das Homogenat wurde 15 min bei 4°C zentrifugiert, das Protein aus dem Überstand gefällt (2.11) und fraktionsweise einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (2.12) unterzogen. Dabei wurden unterschiedliche Mengen Protein (4, 20, 40, 100 und 200 μg) auf ein 15 % SDS-Gel aufgetragen. Das im SDS-Gel getrennte Protein wurde nach 2.13 auf eine Blotmembran transferiert und 5 min mit Coomassie-Färbelösung (2.14) angefärbt. Die getrocknete Membran wurde im Dunkeln auf einen Röntgenfilm gelegt. Die Expositionsdauer betrug 7 d (2.8).

2.2 Hefen

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* (Wildtyp)

Der Wildstamm von *Saccharomyces cerevisiae* wurde uns von Dr. H. Schmidt, Institut für Genetik der TU Braunschweig, zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in Schrägagar-Dauerkulturen folgender Zusammensetzung:

Hefeextrakt	10,0g
Pepton	20,0g
Glucosemonohydrat	20,0g
Agar	20,0g
Aqua dem.	ad 1000,0ml

Die Anzucht erfolgte bei 37°C unter Schütteln (200 rpm). Das Medium hatte folgende Zusammensetzung:

Hefeextrakt	10,0g
Pepton	20,0g
Glucosemonohydrat	20,0g
Aqua dem.	ad 1000,0ml

250-ml Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Medium wurden mit je 2 ml Vorkultur beimpft und ca. 6 h wachsen gelassen bis zu einer OD_{600nm} von 0,9. Anschließend wurden die Hefezellen abzentrifugiert, bei -80°C zwischengelagert oder sofort wie folgt weiterverarbeitet:

8 g Hefezellen wurden in flüssigem Stickstoff mit Seesand gemörsert, in 30 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 30 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10 % Glycerol (v/v), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), pH 7,5) aufgenommen und 1 h auf dem Magnetprüher bei 4°C extrahiert. Nach Zentrifugation (Beckman, SS-34, 20000 g, 4°C, 15 min) wurde der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung nach 2.9.3 unterworfen:

0 – 50 % Sättigung mit 45 min Rühren. Nach dem Abzentrifugieren der 50 %-Fällung wurde gemörsertes Ammoniumsulfat zugegeben, bis die Lösung gesättigt war. Nach weiteren 45 min Rühren wurde das gefällte Protein abzentrifugiert (20000 g, 4°C, 15 min), in 2 ml DHS-Puffer (250 mM Glycin/NaOH, pH 9,5, 1 mM DTT) aufgenommen und über Sephadex G-25 (PD-10-Säulen (2.9.1)) entsalzt. Die Bestimmung der DHS-Aktivität erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

2.3 Bakterielle Expression

2.3.1 Bakterielle Expression rekombinanter Proteine

Die Anzucht der gentechnisch veränderten Bakterienstämme erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C. Eine 25 ml-LB-Agarplatte wurde mit 50 µg/ml Ampicillin bestrichen. Nach dem Trocknen wurde eine Impföse in eine Dauerkultur des jeweils anzuziehenden Bakterienstamms getaucht und auf der Platte ausgestrichen. Nach zwölfstündiger Inkubation wurde ein Klon mit einem sterilen Zahnstocher in 7 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Ampicillin überführt, und in der Vorkultur bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 angezogen. Je 1 ml der Vorkultur wurden in Kolben mit je 50 ml frischem LB-Medium und 50 µg/ml Ampicillin überführt und ebenfalls bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 37°C angezogen. Die Expression erfolgte über drei Stunden bei 37°C durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Zusätzlich wurden einmal 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert und bei –80°C gelagert. Zur Stammerhaltung wurden 750 µl der Vorkultur mit 250 µl LB-Medium, das 60 % Glycerol enthielt, vermischt und bei –80°C gelagert.

2.3.1 Homospermidin-Synthase aus *R. viridis*: *E. coli* BL21 / pHsR_vT₇2.1

Der *E.coli*-Stamm wurde in unserer Arbeitsgruppe von THOLL (1996) im Rahmen ihrer Dissertation mit dem bakteriellen HSS-Gen aus *Rhodopseudomonas viridis* transformiert (THOLL et al., 1996). Eine Überexpression der bakteriellen HSS war mit Hilfe des durch IPTG induzierbaren T₇ RNA Polymerase / Promotorsystems möglich (2.3.1).

2.3.2 eIF5A aus *N. crassa*: *E. coli* M15[pREP4] [pqz30NC21K]

Dieser Stamm enthielt das Plasmid für das eIF5A-Vorläuferprotein aus *Neurospora crassa*, welches wir von der Arbeitsgruppe von CHEN erhielten (TAO und CHEN, 1994). Die Anzucht erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.

2.3.3 Desoxyhypusinsynthase aus *S. vernalis*: *E. coli* BL21 (DE3) I4-2

In diesem Stamm befand sich das Plasmid mit der Erbinformation für die Desoxyhypusinsynthase (DHS) aus *Senecio vernalis*, die ebenfalls von OBER in unserer Arbeitsgruppe kloniert worden war (OBER und HARTMANN, 1999b). Die Anzucht erfolgte abweichend von 2.3.1 über 15 h bei 25°C unter dreimaliger Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin, die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte über 16 h bei 25°C unter erneuter Zugabe von dreimal 50 µg/ml Ampicillin.

2.3.4 Homospermidinsynthase aus *S. vernalis*: *E. coli* BL21 (DE3) B12(3)

Dieser Stamm enthielt ein Plasmid mit der cDNA für die Homospermidinsynthase (HSS) aus *Senecio vernalis* (OBER und HARTMANN, 1999b). Die Anzucht erfolgte abweichend von 2.3.1 über 15 h bei 25°C unter dreimaliger Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin, die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte über 16 h bei 25°C unter erneuter Zugabe von dreimal 50 µg/ml Ampicillin.

2.3.5 eIF5A aus *S. vernalis*: *E. coli* BL21 (DE3) pet23b eIFsv1

Dieser Stamm enthielt das Plasmid für das eIF5A-Vorläuferprotein aus *Senecio vernalis*, welches von OBER kloniert wurde (OBER und HARTMANN, 1999b). Auch hier erfolgte die Anzucht abweichend von 2.3.1. über 15 h bei 25°C unter dreimaliger Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin, die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte über 16 h bei 25°C unter erneuter Zugabe von dreimal 50 µg/ml Ampicillin.

2.4 Ultraschallaufschluß von Bakterienzellen

Bakterienzellen wurden nach Anzucht und Induktion abzentrifugiert und bei -80°C gelagert. Das Bakterienpellet wurde aufgetaut, in 5-20 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,7 resuspendiert, auf Eis gestellt und 10 min mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier, Schallstärke 5, Pulsbehandlung, 50% Pulszeit). Nach 20 min Zentrifugation bei 20000 g (4°C , 15000 Upm, SS-34-Festwinkelrotor, Dupont-Sorvall RC-5B) wurde der Überstand, der das lösliche Protein enthielt, abgenommen und weiter aufgereinigt, oder über PD-10-Säulen entsalzt (2.9.1) und für Aktivitätstests verwendet.

2.5 Derivatisierungen, Präparationen und Synthesen

2.5.1 Qualitative und quantitative Bestimmung der Polyamine

Zur HPLC-Analyse wurden die Di- und Polyamine nach einer Vorschrift von REDMOND und TSENG (1979) benzoyliert, um sie im UV-Detektor bei 230 nm nachweisen zu können. Bis zu 0,5 ml saure Probe wurden mit 0,5 ml 2 N NaOH alkalisiert, mit 10 μl Benzoylchlorid versetzt und 30 s kräftig geschüttelt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von 1 ml gesättigter NaCl-Lösung gestoppt, und die Benzamide wurden mit 2 ml Diethylether ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz 10 min zentrifugiert (7000 Upm, Sigma Tischzentrifuge 201 M), 1 ml der Etherphase wurde unter dem Luftstrom zur Trockne eingeeengt und bei -20°C gelagert. Zur HPLC-Analyse wurden die Proben in 50-100 μl Methanol aufgenommen.

Die HPLC-Analysen wurden mit einer Merck / Hitachi L-6200 Intelligent Pump und dem L 4200 UV-Vis derselben Firma durchgeführt. Die Probenaufgabe erfolgte über ein Rheodyne 7125 Injektionssystem (Probenschleifenvolumen 20 μl). Es wurden RP-18, Nucleosil 120-Säulen (5 μm Korngröße, 250 mm Länge, 4mm i.D.) der Fa. Macherey und Nagel verwendet. Die Trennung der benzoylierten Polyamine erfolgte isokratisch mit einem Fließmittelgemisch Acetonitril / Phosphorsäure (40:60, v/v) nach einer modifizierten Vorschrift von FLORES und GALSTON (1982) mit einer

Flußrate von 1,0 ml/min. Die Detektion der Benzamide erfolgte bei 230 nm (SANDER 1991) mit dem Chromato-Integrator D-2500 (Merck / Hitachi) oder mit dem LB-508 Radioaktivitätsdetektor der Fa. Berthold, der auch für die simultane UV- / Radioaktivitätsdetektion eingesetzt wurde. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des internen Standards Cadaverin. Wegen des höheren Benzoylierungsgrades der Triamine Spermidin und Homospermidin mußte mit einem Korrekturfaktor gearbeitet werden, wenn sie neben den Diaminen Putrescin, Cadaverin etc. bestimmt werden sollten (3.6).

2.5.2 Derivatisierung der Polyamine mit Chlorameisensäuremethylester zur GC-MS-Analyse

Für die GC-MS-Analysen wurden die Polyamine mit Chlorameisensäuremethylester zu Methoxycarbamaten umgesetzt (HUSEK et al. 1992). Die über Dowex 50 W Kationentauscher gereinigten Polyamine (2.9.2) wurden unter dem Luftstrom vollständig vom Lösungsmittel befreit, in 1,5 ml 0,05 N HCl aufgenommen, mit 1 M Natriumcarbonatlösung alkalisiert und mit 20 µl Chlorameisensäuremethylester versetzt. Bei der Reaktion konnte eine deutliche Gasentwicklung beobachtet werden. Nach 15 min Inkubation wurde dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt und die Etherphase unter dem Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt. Die Proben wurden zur GC-MS-Analyse in ca. 10 µl Dichlormethan aufgenommen.

Zur Identifizierung von Reaktionsprodukten der DHS- und HSS-katalysierten Reaktionen wurden die derivatisierten Polyamine mit einem Carlo-Erba Gaschromatographen Mega 5160 getrennt, der direkt mit einem Finnigan MAT 4515 Quadrupol Massenspektrometer gekoppelt war. Die Trennungen erfolgten mit einer DB-1 Kapillarsäule (J&B Scientific CA) von 30 m Länge und einem Innendurchmesser von 0,32 mm mit Methylsilikon als gebundener chemischer Phase. Die Injektortemperatur betrug 250°C, das Splitverhältnis in der Regel 1:20. Als Trägergas diente Helium (0,75 bar). Die Trennung der nach 2.5.2 und 2.5.3 derivatisierten Polyamine erfolgte bei einer Heizrate von 6°C/min mit einem linearen Temperaturprogramm von 150 – 300°C. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte über ihre Retentionsindices (RI), die mit internen Kohlenwasserstoffstandards (C₁₄-C₂₈) bestimmt wurden (WEHRLI und KOVATS,

1955). Zusätzlich konnten ihre Molmassen und die charakteristischen Massenfragmente mit denen von Referenzsubstanzen verglichen werden.

Die Hochauflösungsmessungen wurden mit einem Finnigan MAT 95 (XL Trap) Sektorfeld-Massenspektrometer durchgeführt nach der ESCAN-Methode. Zur Trennung wurde eine 25 m bpx 5-Säule verwendet, die als stationäre Phase ein Methylsilikonöl mit 5% Phenylgruppen trug. Die Trennung erfolgte mit einem linearen Temperaturprogramm von 150 auf 320 °C mit einer Heizrate von 6°C/min.

2.5.3 Proteinhydrolyse und Derivatisierung der Aminosäuren für die GC-MS-Analyse zum Hypusin-Nachweis

Das eIF5A-Protein aus *N. crassa* (ca. 200 µg) wurde nach der Inkubation im DHS-Enzymansatz nach 2.6.2 über das Ni-NTA-Affinitätsmaterial gereinigt (2.9.6), mit 10 N HCl über Nacht gefällt (4°C, Magnetrührer) und mit 4 ml 6 N HCl in einem Pyrex-Röhrchen unter N₂-Atmosphäre für 21 Stunden bei 80°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde unter dem Luftstrom getrocknet, in 1ml H₂O aufgenommen und auf 4 ml des basischen Ionenaustauschers Serdolit CG 120 II (Fa. Serva), der nach Äquilibration in 2 N NH₄⁺ neutral gewaschen wurde, aufgetragen. Die Elution der sauren und neutralen Aminosäuren erfolgte mit 5 x 3 ml 0,5 N NH₄OH, die basischen Aminosäuren u. a. Hypusin und Desoxyhypusin konnten mit 5 x 3 ml 1,5 N NH₄OH eluiert werden. Die Eluate wurden unter dem Luftstrom getrocknet und für die GC-MS-Analyse derivatisiert.

Für die GC-MS-Analyse der Aminosäuren wurden die Hydrolysate nach einer Vorschrift von KAISER et al. (1974) derivatisiert. Abweichend von der Vorschrift wurden die Carboxylgruppen mit Methanol verestert. Dazu wurde HCl-Gas bis zur Sättigung in frisch destilliertes Methanol eingeleitet. Die unter Luftstrom eingedampften und im Vakuumexsikkator getrockneten Hydrolysate wurden in 5 ml Methanol/HCl aufgenommen und im Heizofen bei 100°C für 15 min in verschraubbaren Pyrex-Röhrchen verestert. Anschließend wurde der Ansatz im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Zur Entfernung von Restwasser wurde zweimal in wenig CH₂Cl₂ aufgenommen und wieder abgedampft. Die Derivatisierung der Aminogruppen wurde mit 2 ml Trifluoracetanhydrid in 4 ml CH₂Cl₂ bei 100°C für

12 min im Trockenschrank durchgeführt. Die Probe wurde unter dem Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und zur Analyse nach 2.5.2 in CH_2Cl_2 aufgenommen.

2.5.4 Enzymatische Präparation von Homospermidin mit HSS aus *R. viridis*

Zur Synthese von Homospermidin wurde die rekombinante HSS aus *R. viridis* verwendet. Zur Präparation von nicht markiertem Homospermidin wurde ein 50 ml-Großansatz verwendet in einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,7 mit 2 mM DTE, 10 mM Put, 500 μM NAD^+ und 5 ml eines nach 2.9.1 entsalzten Rohextraktes aus *R. viridis*. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Erlenmeyer-Kolben bei 37°C auf dem Wasserbad. Das Protein wurde am Ende mit 10 N HCl gefällt und abzentrifugiert. Zur Abtrennung des nicht umgesetzten Putrescins aus präparativen Ansätzen wurde ein Dowex-50 W Kationenaustauscher mit einem Vernetzungsgrad von 8% und einer Korngröße von 100-200 mesh (Kapazität: 1,8 meq / g feuchtes Harz) der Fa. Sigma verwendet. Zur Vorbereitung des Harzes wurde erst mit 5 Volumenteilen Ethanol entfettet und dann mit 5 Volumenteilen 2 N HCl gewaschen. 1 ml des gewaschenen Harzes wurden in eine Hülse mit Fritte gegeben und neutral gewaschen. Nach Auftrag von 5 – 100 ml der Polyaminlösung wurde erst mit 5 ml 0,2 N HCl gespült, anschließend wurde mit 70 ml 1,4 N HCl Putrescin selektiv eluiert. Homospermidin konnte erschöpfend mit 30 ml 3 N HCl eluiert werden.

Zur Präparation von $[^{14}\text{C}]$ Homospermidin wurden 5 μCi $[^{14}\text{C}]$ Putrescin (Endkonzentration: 0,87 mM), 500 μM NAD^+ , 10 μl *R. viridis*-Rohextrakt in einem 50 μl -Ansatz 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Fällung des Proteins mit 5 μl 10 N HCl gestoppt, und das Protein wurde abzentrifugiert. Zur Abtrennung des nicht umgesetzten $[^{14}\text{C}]$ Putrescin von $[^{14}\text{C}]$ Homospermidin aus den Ansätzen zur enzymatischen Präparation radioaktiven Homospermidins im Nanomol-Maßstab konnte ein Mikroansatz mit 50 μl des Kationenaustauschers, der mit einer Fritte in eine 200 μl Pipettenspitze eingefüllt und wie vorstehend behandelt worden war, verwendet werden. Die Abtrennung des $[^{14}\text{C}]$ Putrescins aus dem Ansatz erfolgte mit 4 ml 1,4 N HCl, das $[^{14}\text{C}]$ Homospermidin konnte erschöpfend mit 1,6 ml 3 N HCl eluiert werden. Es wurden in beiden Ansätzen Ausbeuten von 75% erzielt. Die Reinheit des gereinigten Homospermidis wurde mit (Radio)-HPLC überprüft (2.5.1).

2.5.5 Synthese von Canavalmin (1,13-Diamino-5,9-diaza-tridecan) und Norspermin (1,11-Diamino-4,8-diaza-undecan)

Canavalmin ($C_4C_3C_4$) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von FUJIHARA et al. (1982) hergestellt. Es diente als GC-MS-Referenzsubstanz zur Identifizierung des Reaktionsprodukts in der HSS-Reaktion. 4 mmol Putrescin wurden auf Eis unter Rühren mit 4 mmol Acetanhydrid tropfenweise versetzt. Anschließend wurde der Ansatz in 40 ml 2-Propanol aufgenommen, und nach Zugabe von 2 mmol 1,3-Dibrompropan 18 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Der Ansatz wurde am Rotationsverdampfer vollständig vom Lösungsmittel befreit und für drei Stunden in 12 N-HCl unter Rückfluß erhitzt, um die Schutzgruppen abzutrennen. Die Ausbeute an Canavalmin lag unter 5%. Nach derselben Vorschrift konnte das Norspermin ($C_3C_3C_3$) dargestellt werden, statt Putrescin wurde hierbei jedoch 1,3-Diaminopropan eingesetzt. Die Ausbeute war ebenfalls sehr niedrig (5%). Eine Abtrennung der synthetisierten Tetraamine aus dem Substanzgemisch war nicht erforderlich. Es sollte nur ein qualitativer Nachweis des Canavalmins und des Norspermins durch Aufnahme eines Massenspektrums erfolgen. Die GC-MS-Analyse erfolgte nach Derivatisierung mit Chlorameisensäuremethylester (2.5.2).

2.6 Methoden zur Bestimmung enzymatischer Aktivität

2.6.1 Bestimmung von HSS-Aktivität (Standardansatz)

Der Standardansatz zur Bestimmung der HSS-Aktivität von HSS und DHS hatte folgende Zusammensetzung:

5µl	[¹⁴ C]Putrescin	(0,05µCi)	18,7µM
5µl	Putrescin		381,3µM
5µl	Spermidin		400 µM
5µl	NAD ⁺		500 µM
20µl	Standardpuffer*		
10µl	Enzymlösung		<u>0,6-3µg Protein**</u>
50µl	Gesamtvolumen		

*0,1 M Glycin/NaOH, pH 9,25, 2 mM Dithioerythritol (DTE), 0,1 mM EDTA

** 0,47-2,35 pkat

Nach 15 min Vorinkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Enzymzugabe gestartet. Aliquots von 8 µl bzw. 10 µl wurden direkt auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen und damit die Reaktion abgestoppt. Für die analytische Trennung der Polyamine wurden DC-Kieselgelplatten der Fa. Merck mit 0,25mm Schichtdicke verwendet (Größe: 10 x 20cm). Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur ohne Kammersättigung mit dem Fließmittel:

Aceton : Methanol : Ammoniak (25%) 40 : 30 : 20 (v/v/v) (TOPPEL, 1987)

Putrescin und Spermidin konnten über eine Laufstrecke von nur 8,5cm voneinander getrennt werden (Rf-Werte: 0,56, bzw. 0,31). Die Detektion erfolgte bei radioaktiv markierten Proben mit dem Rapid Intelligent TLC Analyzer (RITA) der Fa. Raytest. Bei nicht radioaktiven Proben wurde mit dem Ninhydrin-Sprühreagenz angefärbt (STAHL, 1977). Um Spermidin neben Homospermidin (Rf-Wert: 0,28) bestimmen zu können, mußte auf die (Radio-)HPLC (2.5.1) ausgewichen werden, da sich beide Polyamine mit DC nicht zufriedenstellend voneinander trennen ließen. Die

Quantifizierung erfolgte durch Integration der Peakflächen von Putrescin und Homospermidin und Berechnung nach der 100%-Methode.

Zum Schnelltest von HSS-Aktivität, z.B. in Fraktionen bei chromatographischer Aufreinigung der Enzyme, wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

1µl	[¹⁴ C]Putrescin	(0,01µCi)	9,35 µM
1µl	Assay-Mix	Putrescin	90,65 µM
		Spermidin	400 µM
		NAD ⁺	500 µM
8µl	<u>Enzymlösung</u>		
10µl Gesamtvolumen			

Die Entwicklung und Quantifizierung erfolgte wie oben beschrieben.

2.6.2 Standardansatz zur Bestimmung von DHS-Aktivität

Zur Bestimmung von DHS-Aktivität wurde ein modifizierter Aktivitätstest nach SASAKI et al. (1996) angewendet. Der Standardansatz zur Bestimmung der DHS-Aktivität hatte folgende Zusammensetzung:

5 µl	[¹⁴ C]Spermidin (0,114µCi)	10 µM
10 µl	eIF5A	10 µM
5 µl	NAD ⁺	0,5 mM
70 µl	Standardpuffer	
<u>10 µl</u>	<u>0,4µg Enzymprotein</u>	
100µl	Gesamtvolumen	

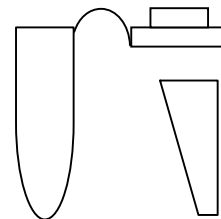


Abb. 2.1: Keilförmiges Filterpapierstückchen im Größenvergleich mit einem 1,5 ml Eppendorf-Reagiergefäß.

Standardpuffer: 100 mM Glycin/NaOH, 2 mM DTE, 0,1 mM EDTA, pH 9,25

Nach 15 min Vorinkubation von Enzym und Reaktionsansatz bei 30°C erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe des Enzyms zum Ansatz. Inkubationen erfolgten über 0,5-60 min bei 30°C. Nach festgelegten Zeiten wurden Aliquots von 25µl entnommen

und in 10 µl 1M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,3, mit 60 mM Spermidin pipettiert. Bei pH 6,3 zeigte die DHS keine Aktivität mehr. Unspezifisch gebundenes [^{14}C]Spermidin wurde kompetitiv durch den Überschuß unmarkierten Spermidins vom Enzymprotein verdrängt. Die Proben wurden durch ein keilförmig zurechtgeschnittenes 3MM-Whatman-Filterpapierstückchen (s. Abb. 2.1) vollständig aufgesaugt, und durch 10 min Erhitzen im Eppendorf-Thermoblock auf 95°C mit 200 µl 10% Trichloressigsäure wurde das Protein im Filterpapier gefällt. Anschließend erfolgten vier Waschungen mit je 2,5 ml 0,2 N HCl und zwei Waschungen mit je 2,5 ml 70% EtOH, um das überschüssige, nichtkovalent gebundene [^{14}C]Spermidin herauszuwaschen. Nach der Trocknung wurde das Filterpapier unzerkleinert in ein 4 ml Kunststoffszintillationsröhrchen überführt, mit 3 ml des hydrophilen Aquasafe[®]-Szintillationscocktails versetzt und die verbliebene kovalent an das Substratprotein gebundene radioaktive Markierung im Szintillationszähler (2.7) vermessen. Die detektierte Markierung im Filterpapier war ein Maß für die DHS-Enzymaktivität.

2.7 Flüssigszintillation

Flüssigszintillationsmessungen wurden mit einem Phillips PW 4700 Szintillationszähler durchgeführt. Bis zu 100 µl wäßriger Proben bzw. getrocknete Filterpapierstückchen aus den DHS-Aktivitätstests (2.6.2) wurden in 4 ml Kunststoffszintillationsröhrchen mit 3 ml Aquasafe[®]-Szintillationscocktail (Fa. Zenker) versetzt, geschüttelt und im Szintillationszähler vermessen. Die Quenchkorrektur erfolgte automatisch. Zur Bestimmung der absoluten ^{14}C -Zerfälle wurde eine externe Quench-Korrektur-Kurve aufgestellt (COOPER, 1980).

2.8 Autoradiographie

Zur autoradiographischen Lokalisation von ^{14}C -markierten Proteinen auf Blotmembranen wurden AGFA-GEVAERT Curix-Röntgenfilmfolien verwendet. Die Expositionsdauer war abhängig von der Konzentration der radioaktiven Markierung im Protein und betrug 3-7 d. Die Entwicklung der Filme erfolgte für 2 min in der

Dunkelkammer in Entwickler (AGFA G230), anschließend wurden die Filme in H₂O / Eisessig (100 : 1, v/v) gewaschen und 20 min in Fixierer (AGFA 305) gelegt. Entwickler und Fixierer wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt.

2.9 Proteinreinigung

2.9.1 Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen mit PD-10-Säulen

Zum Umpuffern und Entsalzen kleiner Volumina wurden PD-10-Fertigsäulen (Betthöhe 5 cm, Ø 1,5 cm) der Fa. Pharmacia eingesetzt. Der Trennbereich des Sephadex G-25 Materials lag zwischen 1000 und 5000 Da, so daß niedermolekulare Substanzen wie Salze, Cofaktoren etc. zurückgehalten wurden, während Proteine mit dem Ausschlußvolumen eluiert wurden. Die Äquilibration der Säule erfolgte mit 30 ml des jeweiligen Puffers. 2,5 ml Probe wurden auf die Säule aufgetragen und vollständig in das Gelbett einziehen gelassen. Anschließend wurde mit 3,5 ml des jeweiligen Puffers das entsalzte Protein eluiert. Kleinere Proteinproben (0,5 – 1,0 ml) wurden in das Gelbett der Säule einziehen gelassen, mit Puffer auf 2,5 ml ergänzt und mit 1,0 bzw. 2,0 ml Puffer eluiert.

2.9.2 Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen

Um größere Volumina an Proteinlösungen schnell entsalzen und einengen zu können, standen Rührzellen der Fa. Amicon zur Verfügung, mit 10, 50 oder 200 ml Fassungsvermögen. Unter Rühren mit einem Magnetrührer wurde ein N₂-Druck von ca. 2 bar erzeugt, durch den die Flüssigkeit durch eine 30 kDa-Membran gepreßt wurde. Die Ultrafiltrationsmembran wurde mit 0,5 N NaCl oder 0,2 N NaOH gereinigt und in 0,05% NaN₃ aseptisch gelagert.

2.9.3 Ammoniumsulfat-Präzipitation

Zur Proteinfällung wurde fein gemörstertes Ammoniumsulfat verwendet. Die Zugabe erfolgte über 30 min bei 4°C auf dem Magnetrührer unter vorsichtigem Rühren. Nach Zugabe der berechneten Menge des Salzes wurde noch 60 min weitergerührt. Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert (Du Pont Sorvall RC-5B, SS-34, 20 min, 15000 rpm, 4°C), vorsichtig in Puffer resuspendiert und für Aktivitätsbestimmungen über PD-10-Fertigsäulen nach 2.9.1 entsalzt. Zur Bestimmung der optimalen Ammoniumsulfatkonzentration wurden fraktionierte Fällungen durchgeführt, und die Enzymaktivität nach der Resuspendierung bestimmt.

2.9.4 Reinigung der DHS über ein dreistufiges säulenchromatographisches Verfahren

DEAE-Fractogel-Anionenaustauschersäule

Die Reinigung der rekombinanten DHS aus *S.vernalis* aus dem BL21-Expressionsstamm erfolgte nach einer Vorschrift von OBER und HARTMANN (1999b). Die abzentrifugierten Bakterien wurden in 20 ml Puffer A resuspendiert und 10 min auf Eis per Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (Beckman-Zentrifuge, Sorvall-Festwinkelrotor SS-34, 20000 g, 20 min, 4°C) und der klare Überstand (22 ml) mit einem Superloop auf die DEAE-Fractogel-Anionenaustauschersäule (Fa. Pharmacia, 8 ml Säulenvolumen) aufgetragen (Flußrate: 2,0 ml/min), die zuvor mit 40 ml desselben Puffers äquilibriert worden war. Nach dem Auftrag der Probe wurde mit 50 ml Puffer A gespült (2,0 ml/min), um nicht bindendes Protein von der Säule zu eluieren. Sobald die Basisabsorptionslinie wieder erreicht war (sichtbar im UV-Kanal bei 280 nm durch Absorption der aromatischen Aminosäuren, Detektorempfindlichkeit: 2,0), erfolgte die Gradientenelution der DHS durch Zumischen des 1M-NaCl enthaltenden Puffers B:

0-100 ml: 0-0,2 M NaCl

100-120 ml: 0,2 M NaCl

120-130 ml: 0,2-1 M NaCl

130-140 ml: 1,0 M NaCl

140-141 ml: 1,0-0 M NaCl

Es wurden Fraktionen zu je 4 ml gesammelt und auf HSS-Aktivität getestet. Die DHS eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,1-0,2 M von der Säule.

Phenylsepharosesäule (Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC))

Die aktiven Fraktionen (insgesamt 24 ml) wurden vereinigt, mit gemörsertem NaCl auf einen Salzgehalt von 1,5 M eingestellt und per Superloop auf die Phenylsepharosesäule (Fa. Pharmacia, 30 ml) aufgetragen (Flußrate: 2,0 ml/min), die vorher mit 100 ml des 1,5 M NaCl haltigen Puffers C äquilibriert worden war. Die Detektorempfindlichkeit wurde ebenfalls auf 2,0 eingestellt. Das Prinzip der hydrophoben Interaktionschromatographie an dem Phenylsepharose-Material beruht darauf, daß die hydrophoben Bereiche des zu reinigenden Proteins unter bestimmten Bedingungen (hohe Salzkonzentration im Puffer) Wechselwirkungen mit dem ebenfalls hydrophoben Säulenmaterial eingehen. Sinkt im Laufe der Elution der Salzgehalt des Puffers, so nehmen die hydrophilen Wechselwirkungen des Proteins mit dem Elutionspuffer zu, so daß das Protein von der Säule eluiert. Durch vermehrte Zumischung des Puffers D, der neben 5 mM Kaliumphosphat kein NaCl enthielt, wurde der NaCl-Gehalt im Elutionspuffer nach und nach auf Null gesenkt:

100 ml Spülen: 1,5 M NaCl

Elution:

0 - 20 ml: 1,5 - 0,6 M NaCl

20 - 120 ml: 0,6 - 0 M NaCl

120 - 200 ml: 0 M NaCl

Es wurden Fraktionen zu je 10 ml gesammelt und auf HSS-Aktivität getestet. Die DHS eluierte bei einem Salzgehalt von 0,6 - 0 M über 80 ml. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, in einer Amicon-Rührzelle (2.9.2) auf den NaCl-freien Puffer A umgepuffert und auf 25 ml eingeeengt.

Mono-Q-Anionenaustauschersäule

25 ml Phenylsepharose-Eluat wurden mit einem Superloop auf die Mono-Q-Anionenaustauschersäule (Fa. Pharmacia, 1 ml Säulenvolumen) aufgetragen

(Flußrate: 0,5 ml/min, Detektorempfindlichkeit: 0,5), die zuvor schon mit 30 ml Puffer A äquilibriert worden war. Auch hier erfolgte die Elution der DHS mit einem NaCl-Gradienten, der durch schrittweise Zunahme des Anteils an Puffer B erreicht wurde:

0 – 10 ml:	0 – 0,1 M NaCl
10 – 60 ml:	0,1 – 0,25 M NaCl
60 – 70 ml:	0,25 – 1,0 M NaCl
70 – 90 ml:	1,0 M NaCl
90 – 91 ml:	1,0 – 0 M NaCl

Es wurden Fraktionen zu je 2 ml gesammelt und auf im HSS-Test auf Aktivität geprüft. Die DHS eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,1 – 0,2 M. Aliquots der aktiven Fraktionen wurden nach 2.12 auf ein 12 %-SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Reagenz angefärbt (2.14). Die Fraktionen, die elektrophoretisch reines DHS-Protein enthielten, wurden auf den 100 mM Glycin-/NaOH-Puffer, pH 9,25 (DHS-/HSS-Puffer) umgepuffert und für weitere Versuche bei –80°C gelagert.

2.9.5 Reinigung der rekombinanten HSS von *S. vernalis* aus *E. coli* BL 21

Die Reinigung der rekombinanten HSS aus *S. vernalis* erfolgte nach demselben Schema, das für die Reinigung der rekombinanten DHS angewendet worden war. Ca. 2 g Bakterienpellet wurden in 20 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer A resuspendiert und per Ultraschall aufgeschlossen. Nach 20 min Zentrifugation (20000 g, 4°C) wurde der klare Überstand per Superloop auf die DEAE-Fractogel-Säule aufgetragen und mit dem NaCl-Gradienten eluiert. Die HSS eluierte bereits bei einer NaCl-Konzentration von 0 – 0,1 M von der Säule. Fraktionen zu je 4 ml wurden gesammelt und auf HSS-Aktivität getestet. Die aktivsten Fraktionen (30 ml) wurden mit NaCl auf einen Salzgehalt von 1,5 M eingestellt und auf die Phenylsepharose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte wie auch bei der DHS durch Verringerung der NaCl-Konzentration im Elutionspuffer. Die HSS eluierte zwischen 0,6 und 0 M über 140 ml. Die aktiven Fraktionen wurden mit der Amicon-Rührzelle auf 16 ml eingeeengt, entsalzt und auf die Mono-Q-Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit demselben NaCl-Gradienten, der bei der DHS angewendet

wurde. Die HSS eluierte bei einem Salzgehalt von 0,05 – 0,2 M. Die HSS-haltigen Fraktionen wurden auf ein 12%-SDS-Gel aufgetragen, und elektrophoretisch getrennt, um die Fraktionen auf Reinheit zu überprüfen. Alle Fraktionen, die das reine Enzymprotein enthielten, wurden vereinigt, auf den 100 mM Glycin-/NaOH-Puffer umgepuffert, aliquotiert und bei –80°C gelagert.

2.9.6 Reinigung der rekombinanten eIF5A-Vorläuferproteine von *Senecio vernalis* und *Neurospora crassa*

Die rekombinanten eIF5A-Vorläuferproteine von *Senecio vernalis*, und *Neurospora crassa*, in *E. coli* exprimiert, besaßen ein 6 x His-tag, welches unter definierten Bedingungen mit einer Ni-NTA-Affinitätsmatrix (Fa. Quiagen) interagiert und sich auch wieder schonend von ihr lösen ließ. Somit war es möglich, die rekombinanten Proteine über eine Ein-Schritt-Prozedur zu reinigen: 4ml der Ni-NTA-Affinitätsmatrix wurden in eine leere PD 10-Hülse gefüllt und mit 40 ml Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) äquilibriert. Der Überstand des resuspendierten, aufgeschlossenen und abzentrifugierten Bakterienpellets (ca. 7ml) wurde mit der Affinitätsmatrix über 2 Stunden end-over-end bei 4°C inkubiert und ablaufen gelassen. Anschließend wurde mit 6 x 4 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) gespült und schließlich mit 10 x 1,5 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0) eluiert. Das gereinigte Protein wurde auf den Standard-Aufbewahrungspuffer (5 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 10% Glycerol, pH 9,0) umgepuffert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.10 Proteinbestimmung

Die Proteingehaltsbestimmungen der Enzymlösungen wurden nach einer Methode von BRADFORD (1976) durchgeführt. Dabei wurden zu 100 µl Proteinlösung 2 ml Bradford-Reagenz zugegeben, umgerührt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und

bei 595 nm im Novaspec II-Photometer (Pharmacia) vermessen. Unter identischen Bedingungen wurde eine Kalibriergerade mit 0-12 µg BSA/100µl Proteinlösung aufgenommen, mit deren Hilfe die Menge an Protein in der Analysenlösung ermittelt werden konnte. Das Bradford-Reagenz hatte folgende Zusammensetzung:

70 mg Serva Blue G wurden in 50 ml 95% Ethanol gelöst, nach Zugabe von 100 ml 85% Phosphorsäure mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und filtriert.

2.11 Proteinschnellfällung mit TCA

Um auch stark verdünnte Proteinproben SDS-elektrophoretisch untersuchen zu können, war es erforderlich, das Protein aus Probenvolumina von bis zu 1,0 ml zu fällen. Dazu wurden zur Probe 1/10 Volumenteil 0,1 % (w/v) Na-Desoxycholat in 0,02 % NaN_3 (w/v) und dann 1/10 Volumenteil 55 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gegeben. Nach Schütteln wurde die Probe für 15 min bei 4°C inkubiert und bei 13000 Upm (Sigma 201 M Tischzentrifuge) für 15 min zentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden in gleichen Teilen 1,5 M Tris / HCl-Puffer pH 8,8 und 2 x Probenpuffer aufgenommen und mit SDS-PAGE analysiert (2.12).

2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben mit SDS-Polyacrylamid-Flachgelelektrophorese (LAEMMLI, 1970) erfolgte mit einer vertikalen Mini-Gelkammer (Mini Protan II, Fa. Biorad). Als Spannungsquelle diente ein Pharmacia LKB Multidrive XL Power Supply. Die Trenngele waren 5 cm lang, die Sammelgele 2 cm bei einer Dicke von 0,5 mm. Bei einer Gelbreite von 8 cm konnten bis zu 10 Proben nebeneinander aufgetragen werden. Es wurden je 10 µl Probe mit 10 µl Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C im Thermoblock denaturiert. Je 15 µl dieser Probe wurden auf das Sammelgel aufgetragen (1-50 µg Protein). Als Molekulargewichtsmarker diente die 10 kDa Protein Leiter (10-200 kDa) der Fa.

Gibco BRL. Die Elektrophorese erfolgte über ca. 60 min bei konstanter Spannung von 200 V und 75 mA.

Die Gele wurden folgendermaßen hergestellt:

Reagenz	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%):
H ₂ O dem.	3,3 ml	3,4 ml
30% Acrylamid-Stammlösung (29,2% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (v/v))	4,0 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl , pH 8,8 (T)	2,5 ml	-----
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8 (S)	-----	0,63 ml
SDS (10%)	0,1 ml	0,05 ml
APS (10%)	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	4,0 µl	5,0 µl

Die Polymerisation des Gels wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED gestartet. Das Volumen von 10 ml bzw. 5 ml reichte aus für 2 Gele. Proben- und Elektrodenpuffer hatten folgende Zusammensetzung:

2 x Probenpuffer:

H ₂ O dem.	4,0 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml
Glycerin	0,8 ml
SDS 10 %	1,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
0,05 % (w/v) Bromphenolblau	0,2 ml

Elektrodenpuffer:

Tris	3,0 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
H ₂ O dem.	ad 1000 ml

2.13 Blotten von Elektrophoresegelen

Zum Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf eine Membran („Blotten“) wurde die Multiphor II Nova Blot electrophoretic transfer unit (Pharmacia) und das Multidrive XL (Pharmacia) als Spannungsquelle verwendet.

Der Transfer geringer Mengen Protein von SDS-Gelen auf PVDF- (Polyvinylidendifluorid-) Membranen (Immobilon P; Millipore) wurde im „semi-dry“-Verfahren durchgeführt. Die Blotmembran wurde kurz mit Methanol benetzt und mit 4 Lagen auf Gelgröße zurechtgeschnittenem Whatman-Papier (3 MM, Schleicher & Schuell) einige Minuten in 1 x Blotpuffer äquilibriert. Nach Befeuchtung der Graphitplatten der Blotkammer mit 1 x Blotpuffer wurden die Lagen luftblasenfrei folgendermaßen aufeinander geschichtet:

obere Graphitplatte (Anode, +)
 Lagen Whatman-Filterpapier
 PVDF-Membran
 SDS-Gel
 Lagen Whatman-Filterpapier
 untere Graphitplatte (Kathode, -)

Der Transfer erfolgte über 1 h bei 120 mA für ein Gel, bzw. bei 160 mA für zwei Gele. Der 1 x Blotpuffer wurde kurz vor Gebrauch aus 10 x Blotpuffer, Methanol und Wasser hergestellt (Zusammensetzung s. u.).

1 x Blotpuffer		10 x Blotpuffer	
10 x Blotpuffer	100 ml	Tris-Base	58,0 g
Methanol	200 ml	Glycin	29,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml	SDS	3,7 g
		H ₂ O	ad 1000 ml

2.14 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen und Blotmembranen

Nach Beendigung der SDS-PAGE (2.12) wurden die Gele aus der Apparatur genommen und in der Färbelösung für 60 min unter Schwenken eingefärbt. Durch Behandlung mit Entfärber 1 (30 min) und Entfärber 2 wurde das Gel entfärbt, bis der Hintergrund klar war. In Entfärber 2 konnten die Gele auch über Monate gelagert werden. PVDF-Membranen wurden nach dem Transfer des Proteins mit H₂O abgespült und 5 min in der Färbelösung angefärbt. Die Entfärbung erfolgte 5 – 10 min in Entfärber 1. Anschließend wurde die Membran erneut mit H₂O gespült und getrocknet. Färbelösung und Entfärber 1 und 2 waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Reagenz	Färbelösung
Coomassie-Stammlösung (1,0 g Coomassie-Brilliant-Blau R-250 in 100 ml H ₂ O dem.)	25 ml
Methanol	100 ml
Eisessig	20 ml
H ₂ O dem.	ad 200 ml

Reagenz	Entfärber 1	Entfärber 2
Methanol	100 ml	10 ml
Eisessig	20 ml	14 ml
H ₂ O dem.	ad 200ml	ad 200 ml

2.15 Puffersysteme

Für die Reinigung der HSS bzw. der DHS wurden folgende Reinigungspuffer verwendet (OBER 1997):

Reagenz	Puffer A	Puffer B	Puffer C	Puffer D
KH ₂ PO ₄	50 mM	50 mM	5 mM	5 mM
DTE	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
EDTA	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
NaCl	-----	1 M	1,5 M	-----
pH	8,7	8,7	8,7	8,7

Der DHS-/HSS-Standardpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

Glycin / NaOH	100 mM	
DTE	2 mM	
EDTA	0,1 mM	pH 9,25

Der 10 x PBS-Puffer enthielt:

NaCl	80,0 g	
KCl	2,0 g	
Na ₂ HPO ₄	14,4 g	
KH ₂ PO ₄	2,4 g	
H ₂ O	ad 1000 ml	pH 7,2

Vor dem Gebrauch wurde mit Wasser 1:10 verdünnt.

2.16 Chemikalien

Es wurden die Chemikalien des Reinheitsgrades „p.a.“ oder „reinst“ folgender Firmen für die Versuche verwendet:

Baker-Mallinckrodt	Rialuma [®] -Szintillationscocktail
Boehringer Mannheim	
Bioproducts (Serva)	Puffersubstanzen
Fluka	Acetonitril, Puffersubstanzen, EDTA, Benzoylchlorid
Gerbu	Puffersubstanzen, DTE, DTT, NAD ⁺
Gibco BRL	10 kDa-Proteinleiter
Linde	sämtliche Gase
Merck	diverse Chemikalien
Pharmacia	PD-10-Fertigsäulen
Quiagen	Ni-NTA-Affinitätsmatrix
Riedel de Haën	Acetonitril für HPLC
Roth	Glycin für Puffer
Sigma	Dowex-50 W H ⁺ -Kationenaustauscher, Di- und Polyamine

Alle wäßrigen Lösungen wurden mit Aqua bidest. Oder MilliQ-Wasser (Millipore) angesetzt.

2.17 Radiochemikalien

Die Radiochemikalien wurden von der Fa. Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen:

[1,4-¹⁴C] Putrescin-Dihydrochlorid (118 mCi/mmol)

[1,4-¹⁴C] Spermidin-Trihydrochlorid (115 mCi/mmol)

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zum biochemischen Nachweis von eIF5A in WOK von *Senecio vernalis*

Die DHS katalysiert die Übertragung eines Aminobutylrests von Spermidin auf einen spezifischen Lysinrest des eIF5A-Vorläuferproteins. Um die DHS-Aktivität in WOK von *S. vernalis* biochemisch nachzuweisen, wurde versucht, das eIF5A-Vorläuferprotein in Fütterungsversuchen mit [^{14}C]Spermidin radioaktiv zu markieren, zu extrahieren, mit SDS-PAGE aufzutrennen und durch Autoradiographie nachzuweisen. Aus Versuchen mit tierischen Zellen war bekannt, dass die DHS in besonders hohen Konzentrationen in stark proliferierendem Gewebe vorkommt (WOLFF et al., 1995). Aus diesem Grund wurden für die Markierungsversuche junge frisch gebildete Wurzelspitzen verwendet. 1,0 g frisches Wurzelmaterial (Abtropfgewicht) wurde in 25 ml Erlenmeyerkolben mit je 5 ml sterilem MSOH-Medium überführt. Ca 2 μCi [^{14}C]Spermidin (Endkonzentration im Medium: 3,34 μM) wurden dem Medium zugefügt und die Kulturen unter Standardbedingungen wachsen gelassen. Zu festgesetzten Zeiten wurden Proben des Mediums genommen und die Radioaktivität im Szintillationszähler vermessen. Nach 24 h waren bereits 75 %, nach 48 h über 80 % der gefütterten Radioaktivität aufgenommen worden (Abb. 3.1). Aufarbeitung des Wurzelmaterials, SDS-PAGE, Blotting, Färbung des Gels und Autoradiographie erfolgten wie unter 2.1.2 beschrieben. Nach Entwicklung des Roentgenfilms konnte jedoch auch bei hoher Beladung der Gele keine Schwärzung des Films festgestellt werden. Offensichtlich war die Methode nicht empfindlich genug, um geringe Mengen an radioaktiv markiertem eIF5A nachweisen zu können.

Versuche zum direkten Nachweis von DHS-Aktivität in Wurzeln wurden nicht weiterverfolgt, da schon abzusehen war, dass sowohl DHS als auch eIF5A aus *Senecio vernalis* in rekombinanter Form zur Verfügung stehen würden. Stattdessen wurde an einem Modellorganismus, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, versucht, eine Methode zur Bestimmung der DHS-Aktivität zu etablieren.

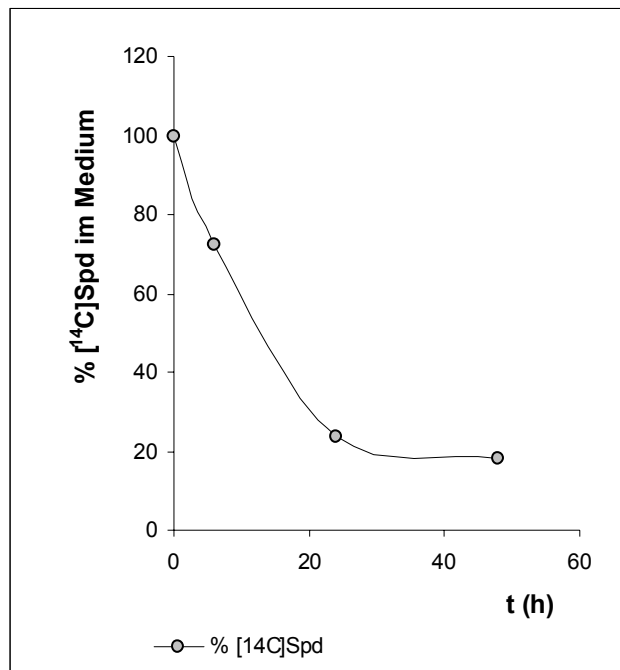


Abb. 3.1 Aufnahme von [^{14}C]Spermidin durch WOK von *S. vernalis* aus dem MSOH-Medium.
Erklärung im Text

3.2 Etablierung und Optimierung einer Methode zur Bestimmung der DHS-Aktivität

Zur Bestimmung von DHS-Aktivität wurden verschiedene Methoden beschrieben, die auf dem Prinzip beruhen, das eIF5A-Vorläuferprotein mit [^{14}C]Spermidin oder [^3H]Spermidin radioaktiv zu markieren. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Isolierung des isotope markierten eIF5A aus den Inkubationsansätzen. Die Bestimmung der DHS-Aktivität erfolgte mit Hilfe von Flüssigszintillationsmessungen des isolierten markierten eIF5A, oder durch den Nachweis des gebildeten Desoxyhypusins mit radiochemischen Analysenmethoden. Nachfolgend wird eine kurze Übersicht über die in verschiedenen Veröffentlichungen eingesetzten Methoden gegeben.

Trennung mit SDS-PAGE

Bei dieser von CHEN und DOU (1988b) und DOU und CHEN (1990) beschriebenen Methode wurde das Substratprotein im Inkubationsansatz durch die DHS mit

[³H]Spermidin radioaktiv markiert. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und Ausschneiden der Proteinbande wurde die kovalent an den Faktor gebundene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt.

Metallchelat-Affinitätschromatographie

Diese Methode wurde von TAO et al. (1994) beschrieben und unter Verwendung eines gentechnisch veränderten eIF5A-Vorläuferproteins durchgeführt. TAO und CHEN (1994) tauschten bei der Transformation des eIF5A-Gens aus *Neurospora crassa* in *E. coli* die Codons für die ersten drei Aminosäuren gegen Codons für sechs Histidine aus, was die Eignung als Substrat für das Assay nach der Expression nicht beeinträchtigte. Das rekombinante eIF5A mit dem 6 x His-tag konnte nach der Inkubation durch Bindung an eine Ni(II)-NTA-Agarose-Affinitätsmatrix selektiv aus Inkubationsansätzen abgetrennt werden. Nach Überführung des matrixgebundenen Proteins auf eine Nitrocellulosemembran und Waschung der Membran mit einer spermidinhaltigen Pufferlösung zur Verdrängung des nicht kovalent gebundenen [¹⁴C]Spermidin erfolgte die Bestimmung der kovalent an eIF5A gebundenen Radioaktivität im Szintillationszähler. Diese Methode wurde nicht weiterverfolgt, da der materielle Aufwand, insbesondere der Verbrauch an Ni(II)-NTA-Agarose-Affinitätsmatrix, zu hoch erschien. Zudem erschien das Verfahren für die Routinebestimmung von DHS-Aktivität zu umständlich.

Abtrennung des aminobutylierten eIF5A-Proteins durch Gelfiltration

KLIER et al. (1995) trennten das Substratprotein nach erfolgter Inkubation (2 h, 37°C) von dem eingesetzten [¹⁴C]Spermidin, indem sie den Ansatz über eine PD-10-Säule gaben und danach das markierte Protein im Flüssigszintillationszähler bestimmten. Diese Methode war schnell durchzuführen, jedoch fielen durch die Äquilibration der PD-10-Säulen große Mengen radioaktiv kontaminierter Waschlösung an. Zudem war die saubere Entsalzung von Aliquots im Mikrolitermaßstab mit den PD-10-Säulen, die eher für größere Volumina konzipiert waren, nicht zufriedenstellend durchzuführen. Diese Methode wurde deshalb nicht berücksichtigt.

Filterpapiermethode

Eine weitere einfache Methode beruhte auf der Bestimmung der Markierung durch [^{14}C]Spermidin im Substratprotein nach Abstoppen der Reaktion und Absorption des kompletten Ansatzes an ein Filterpapier (SASAKI et al., 1996). Die Inkubation wurde über 30 min bei 25°C durchgeführt (Glycin-/NaOH-Puffer, pH 9,5), der Ansatz durch ein Filterpapier aufgesaugt und mit 3,8% Trichloressigsäure (TCA) für 10 min bei 90°C inkubiert. Nach mehreren Waschungen mit 0,2 N HCl und Ethanol wurde die im Filterpapier verbliebene Radioaktivität im Szintillationszähler vermessen. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Methode wurde bei dieser Methode keine polyaminhaltige Waschlösung eingesetzt, um unspezifisch an eIF5A und DHS gebundenes isotoopenmarkiertes Spermidin zu verdrängen. Da diese Methode einfach und schnell durchführbar schien, sollte sie in modifizierter Form an Enzympräparationen aus *Saccharomyces cerevisiae* getestet werden, um Erfahrung mit dem Assay zu sammeln.

Zur Entwicklung einer zuverlässigen Methode zum Nachweis von DHS-Aktivität, wurde ein Organismus ausgewählt, der das Enzym erwiesenermaßen enthält, die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (SASAKI et al., 1996). Vorteilhaft waren die einfache Anzucht, das relativ schnelle Wachstum der Hefen sowie die unproblematische Aufarbeitung der Hefezellen. Wegen der Einfachheit und des geringen Materialaufwandes wurde die zuvor beschriebene Filterpapiermethode angewendet. Da auch das natürliche Substrat der DHS, der eIF5A aus *Senecio vernalis*, zu dem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand, wurde das rekombinante Vorläuferprotein aus *Neurospora crassa* (eIF5A-NC21K) für die Assay-Entwicklung verwendet. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der eIF5A verschiedener Spezies war zu hoffen, dass das eIF5A-Vorläuferprotein aus *Neurospora* das native Hefeprotein als Substrat ersetzen konnte. 8 g Hefezellen wurden nach 2.2.1 aufgeschlossen, das Protein extrahiert und über PD-10-Säulen entsalzt. Es konnten mit dieser Methode 3,5 ml Proteinlösung mit insgesamt 52,6 mg Protein gewonnen werden. Die Reaktionsansätze wurden in 250 mM Glycin-/NaOH-Puffer, pH 9,5, 1 mM DTT bei 30°C über 45 min inkubiert. Nach der Methode von TAO und CHEN (1994) wurden die 50 µl-Ansätze jeweils mit 10 µl eines 1 M Kaliumphosphatpuffers, pH 6,3 abgestoppt. Der Kaliumpuffer enthielt zusätzlich noch 60 mM [^{12}C]Spermidin, um enzymgebundenes [^{14}C]Spermidin kompetitiv zu verdrängen (modifiziert nach

PARK und WOLFF, 1988). Die Probe wurde durch ein Filterpapierstück aufgesaugt, mit 3,8% Perchlorsäure gefällt und 10 min auf 90°C erhitzt. Die Filterpapierstückchen wurden viermal mit je 2,5 ml 0,2 N HCl und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und im Flüssigszintillationszähler vermessen. Die im Filterpapier gemessene Radioaktivität war ein Maß für die Enzymaktivität und sollte in einem Komplettansatz nach 45 minütiger Inkubation meßbar sein. Es wurden verschiedene Reaktionsansätze gestartet, um das Assay auf Funktionsfähigkeit zu überprüfen (siehe Tab. 3.1): Die 0,5 – und 45 Minuten-Werte der unvollständigen Ansätze b – e sollten idealerweise bei Null liegen.

Ansatz		¹⁴ C-cpm	
		0,5 min	45 min
a	komplett	315	1510
b	ohne [¹⁴ C]Spermidin	30	22
c	ohne eIF5A-Vorläuferprotein	336	251
d	ohne Enzym	150	138
e	Blindwert ([¹⁴ C]Spermidin ohne Enzym, ohne eIF5A- Vorläuferprotein)	136	164

Tab. 3.1 ¹⁴C-Markierung im DHS-Assay für die DHS aus *S. cerevisiae*

Tatsächlich lag die ¹⁴C-Markierung im Komplettansatz a (10 µM [¹⁴C]Spermidin, 3 µM eIF5A-Vorläuferprotein, 500 µM NAD⁺, 0,57 mg Enzymprotein) nach 45 min Inkubation deutlich über der in allen anderen Ansätzen (1510 cpm). Die etwas erhöhten Werte im Inkubationsansatz ohne Substratprotein (251 cpm) waren vermutlich auf das noch in der Enzymlösung vorhandene native *Saccharomyces cerevisiae*-Substratprotein zurückzuführen. Ansätze mit [¹⁴C]Spermidin und eIF5A ohne Enzym (d) und [¹⁴C]Spermidin allein (e) hinterließen nach dem Herunterwaschen des Inkubationsansatzes ein radioaktives „Grundrauschen“ von 138 bzw. 164 cpm. Um dieses Ergebnis abzusichern, wurden zwei Inkubationsansätze über 60 min gestartet, ein Komplettansatz mit 10 µM [1,4-¹⁴C]Spermidin und 15 µM eIF5A-Vorläuferprotein und ein Ansatz mit 10 µM [1,4-¹⁴C]Spermidin und ohne das Substratprotein. Nach Abstoppen der 50µl-Aliquots, Absorption an das Filter und Waschung der Filterpapierstückchen wurde die radioaktive Markierung im Szintillationszähler bestimmt (Abb. 3.2). Im

Komplettansatz konnte mehr radioaktive Markierung im Substratprotein festgestellt werden (2647 cpm nach 60 min), als im Ansatz ohne Faktor (658 cpm nach 60 min). Auch hier fand sich Radioaktivität im Filterpapier, die vermutlich durch das Vorhandensein von *S. cerevisiae*-eIF5A in der teilgereinigten Enzymlösung verursacht worden war.

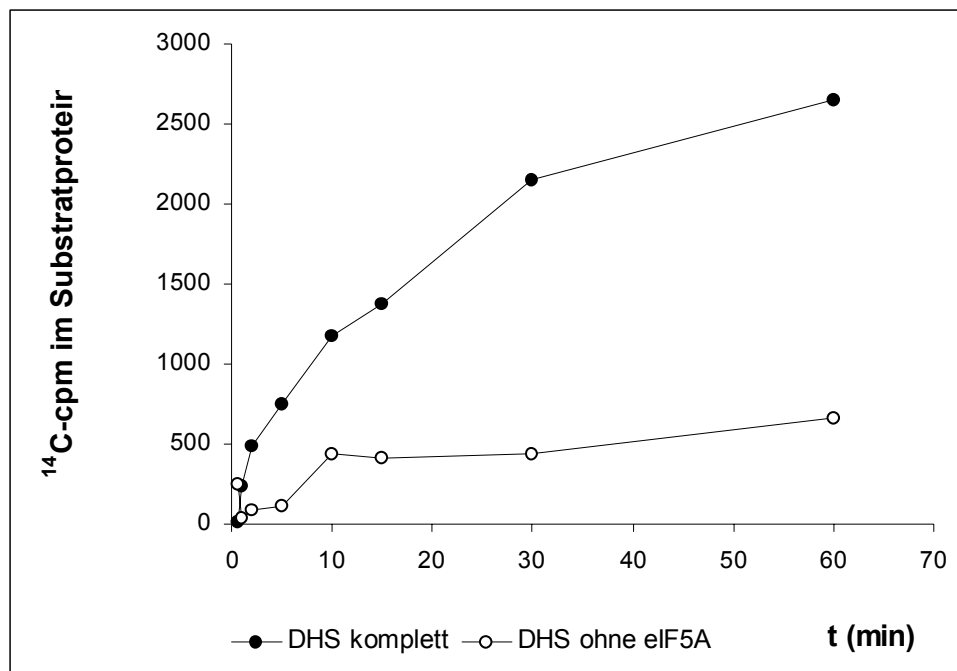


Abb. 3.2 Zeitabhängigkeit der DHS-Reaktion der DHS aus *S. cerevisiae* mit und ohne Zugabe von eIF5A-Vorläuferprotein. Die Inkubation erfolgte bei 30°C über 60 min, die Auswertung nach 2.6.2

Um sicherzustellen, daß es sich bei der gemessenen Radioaktivität im Filterpapier nicht um ein Artefakt handelte, sollte das entstandene Desoxyhypusin nach erfolgter DHS-Reaktion durch saure Hydrolyse des Faktors und GC-MS-Analyse der resultierenden Aminosäuren nachgewiesen werden. Es wurde ein Ansatz ohne radioaktiv markierte Substrate gestartet, der folgende Zusammensetzung hatte:

125 µM Spermidin

0,5 mM NAD⁺

3µM eIF5A-Vorläuferprotein (*N. crassa*)

9 mg Enzymprotein

1000 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde über 16 Stunden bei 30°C inkubiert, und das modifizierte eIF5A-Vorläuferprotein wurde nach 2.9.6 über eine Ni-(II)-NTA-Agarose-Affinitätsmatrix abgetrennt. Die Hydrolyse des Proteins und chromatographische Abtrennung der basischen Aminosäuren erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben. Nach Derivatisierung der Aminosäuren mit Trifluoressigsäureanhydrid erfolgte die GC-MS-Analyse. Im Ansatz konnte Desoxyhypusin nachgewiesen werden. (Abb. 3.3).

Der gefundene Retentionsindex 2199 des abgebildeten Derivats lag im erwarteten Bereich. Die im Spektrum gefundenen charakteristischen Fragmente des Desoxyhypusins ließen sich wie folgt erklären:

Die Fragmente 126, 293, 365 und 393 entstanden durch Spaltung des Moleküls hinter dem α -Kohlenstoffatom der derivatisierten Aminogruppe (α -Spaltung). Das Fragment 180 mit der größten Intensität aller auftretenden Fragmente stammte aus der Lysinhälfte des Desoxyhypusins. Das erwartete Molekülion $M^+=519$ wurde im Spektrum nicht angetroffen, wohl aber das um 32 Masseneinheiten kleinere Fragment 487, das durch Abspaltung von Methanol entstand. Offensichtlich lag der Anteil des nicht-fragmentierten Desoxyhypusinderivats unterhalb der Nachweisgrenze.

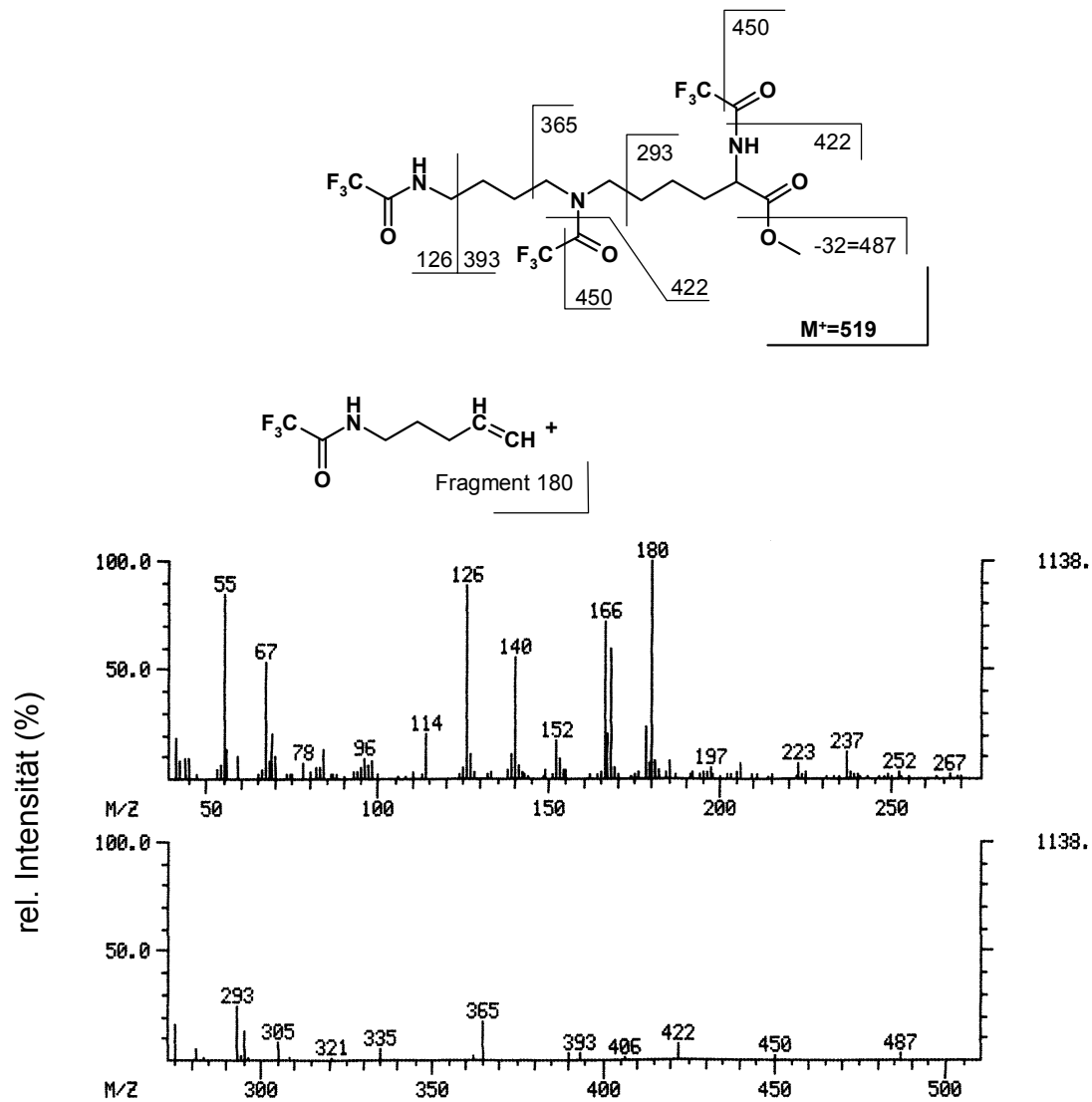


Abb. 3.3 Identifizierung von Desoxyhypusin nach saurer Hydrolyse des aminobutylierten eIF5A aus *N. crassa*. Die Aminosäuren wurden in Form ihrer Trifluoracetylderivate nachgewiesen. Die Abbildung zeigt Strukturformel mit Fragmentierungsmuster, einigen charakteristischen Ionen und dem Massenspektrum des nach 2.5.3 derivatisierten Desoxyhypusins (RI = 2199) aus dem Inkubationsansatz mit der DHS aus *S. cerevisiae*. Das Molekülion 519 trat nicht auf.

Der beschriebene Inkubationsansatz zur Bestimmung der DHS-Aktivität (Abb. 3.2) wurde in modifizierter Form erneut mit der von OBER 1999 klonierten rekombinanten DHS und dem rekombinanten Faktor aus *Senecio vernalis* durchgeführt (Abb. 3.4). Es zeigte sich nur im Komplettansatz (2,5 μM [^{14}C]Spermidin, 10 μM eIF5A, 0,5 mM NAD^+ , 3,2 μg Enzym) Aktivität (1500 cpm nach 10 min), während im Ansatz ohne Vorläuferprotein keine Zunahme der Markierung im Substratprotein zu erkennen war.

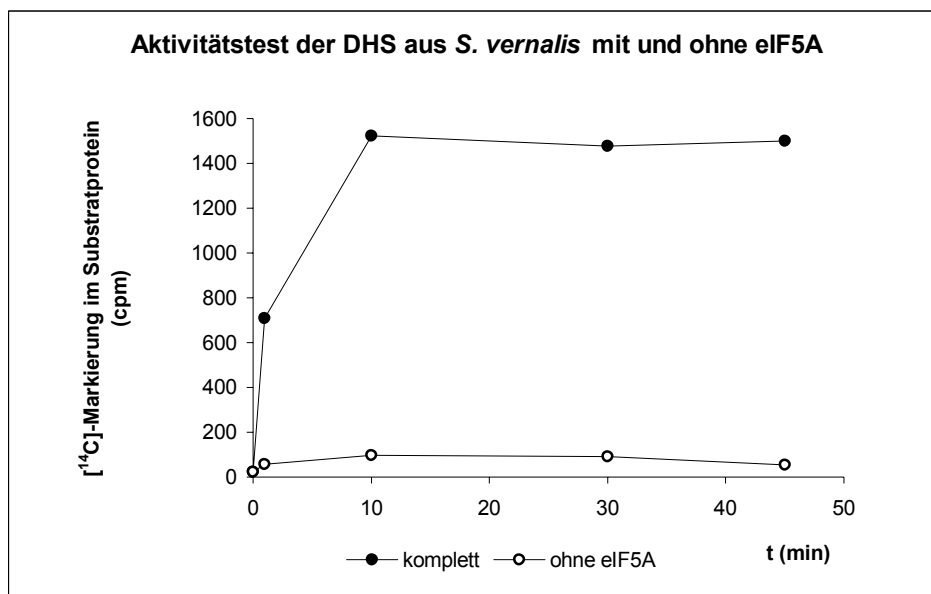


Abb. 3.4 Zeitabhängigkeit der Desoxyhypusinbildung bei der DHS aus *S. vernalis* im DHS-Assay mit und ohne rekombinantes eIF5A-Vorläuferprotein. Die Inkubation erfolgte, anders als bei dem Experiment mit der *S. cerevisiae*-DHS, bei 30°C und über 45 min, die Auswertung erfolgte nach 2.6.2

Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass durch die Limitierung des Substrats [^{14}C]Spermidin und die hohe Konzentration Enzymprotein im Reaktionsansatz schon nach 10 min kein Umsatz des Substratproteins mehr erfolgt. Da es für die nachfolgenden kinetischen Untersuchungen wichtig war, die Enzymaktivität möglichst exakt bestimmen zu können, musste der Bereich ermittelt werden, in dem eine Linearität des Umsatzes bei vorgegebener Enzymkonzentration gewährleistet war. Es wurden Ansätze mit 500 mM NAD^+ , 10 μM eIF5A, 5 μM [^{14}C]Spermidin und 0,2, 0,4 und 0,8 μg rekombinanter DHS aus *S. vernalis* gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 30°C über 60 min (Abb. 3.5). Es wurde ermittelt, dass im Ansatz mit 0,4 μg DHS der Umsatz während der ersten 15 min im linearen Bereich lag.

Dementsprechend wurden bei weiteren DHS-Aktivitätsmessungen die Messzeitpunkte und Enzymkonzentrationen gewählt.

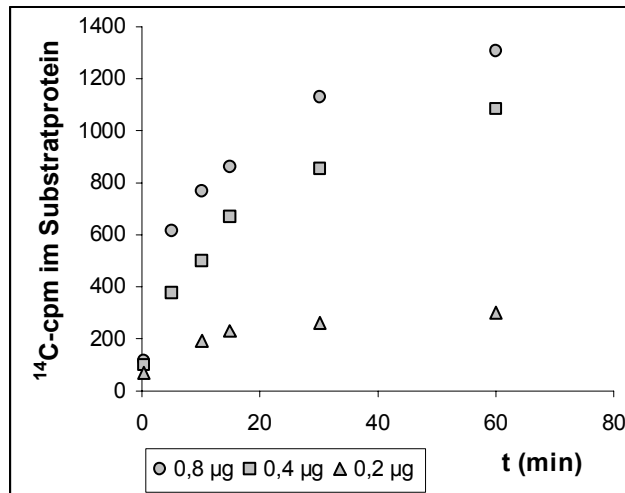


Abb. 3.5 Bestimmung des linearen Bereichs der DHS-Reaktion mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen im modifizierten Standardinkubationsansatz nach 2.6.2. Erklärung im Text

Weiterhin wurde getestet, ob auch unter Variation der eIF5A-Konzentration (1, 2, 3 und 10 μM eIF5A) mit 0,8 μg Enzym und gleicher [^{14}C]Spermidin-Konzentration (10 μM) Messungen im linearen Bereich möglich waren. Nach 15 min Vorinkubation bei 30°C wurden die Ansätze durch Zugabe des Enzyms gestartet. Über eine Zeit von 15 min konnte in allen Ansätzen eine Linearität des Umsatzes beobachtet werden (Abb. 3.6). Diese Versuche zeigten, dass mit dem hier erprobten DHS-Assay eine Methode zur Verfügung stand, mit der weitergehende kinetische Untersuchungen (Bestimmung von K_M -Werten und Hemmstoffversuche) durchgeführt werden konnten.

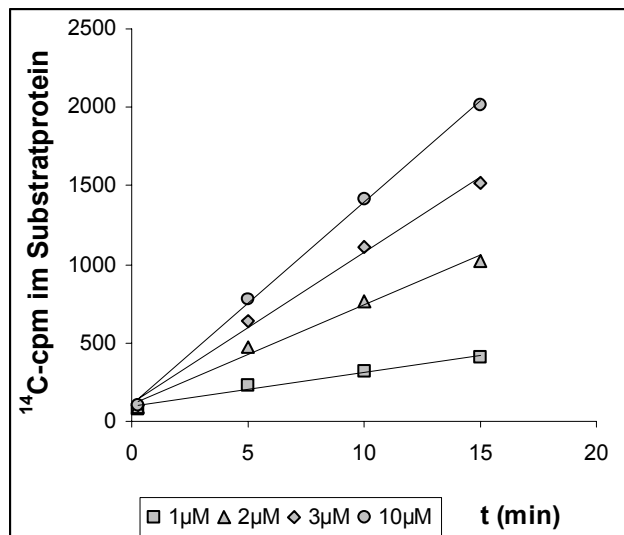


Abb. 3.6 DHS-Inkubationsansätze mit verschiedenen eIF5A-Konzentrationen sowie konstanten Enzymmengen (0,8 μ g) und Spermidin-Konzentrationen (10 μ M) zur Ermittlung des linearen Bereichs.

3.3 Anzucht des *E.coli* BL 21 (DE3) pet 23b eIFsv1 und Reinigung des rekombinanten eIF5A-Vorläuferproteins von *Senecio vernalis*

Nachdem die Klonierung und Expression des eIF5A-Vorläuferproteins aus *Senecio vernalis* in *E.coli* BL 21 in unserem Arbeitskreis gelungen war (OBER und HARTMANN, 1999b), stand für ein DHS-Assay auch das natürliche rekombinante 17,3 kDa große eIF5A zur Verfügung. Die Anzucht und Expression erfolgte wie unter 2.9.6 angegeben bei 25°C. Das rekombinante Protein mit dem His-tag konnte über eine Ein-Schritt-Reinigung mit der Ni-(II)-NTA-Agarosematrix von den Begleitproteinen abgetrennt werden. Die Reinheit des Eluats wurde mit SDS-PAGE überprüft (2.12). Wie Abb. 3.7 zeigt, enthielten bereits die Waschfraktionen W1-W6 reines eIF5A. Somit reichten schon geringere Konzentrationen Imidazol im Waschpuffer (10 mM) aus, um einen Teil des eIF5A von der Matrix zu eluieren. Die Wasch- und Elutionsfraktionen, die reines eIF5A-Vorläuferprotein enthielten (W3-W6, L und E2–E3), wurden vereinigt, umgepuffert (5 mM Tris / HCl, 1 mM DTT, 10 % Glycerol, pH 9,0) und bei –80°C gelagert. Nach dieser Reinigung standen ca. 10 mg reines eIF5A für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

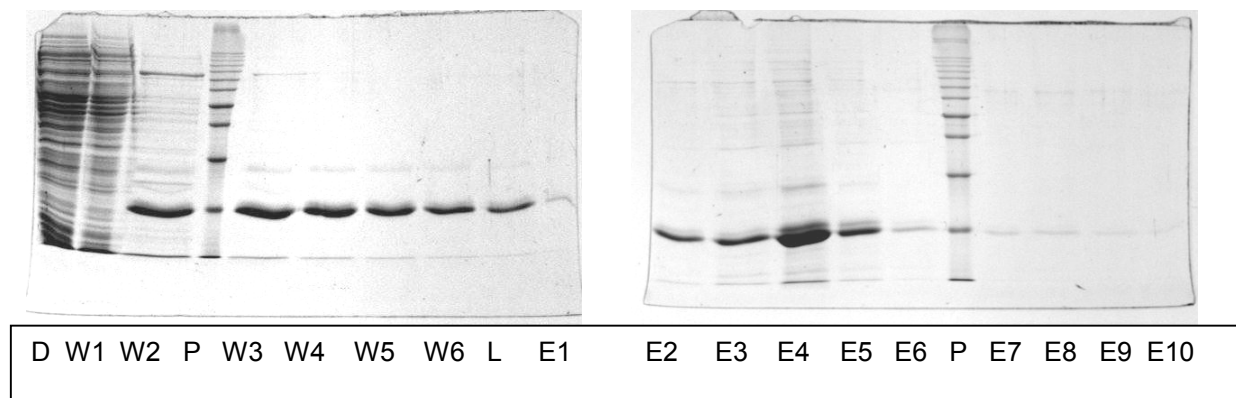


Abb. 3.7 15%-SDS-Gel der Elutionsfraktionen des 17,3 kDa großen rekombinanten eIF5A-Vorläuferproteins (eIFsv1) von *Senecio vernalis*.

D: Durchlauf

W: Waschfraktionen (je 4 ml)

P: 10-kDa-Proteinleiter

L: Lysispuffer (4 ml)

E: Elutionspuffer (je 1,5 ml)

3.4 Reinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *Senecio vernalis*

Die Anzucht der Bakterien und Expression der beiden Enzyme erfolgte wie unter 2.3.4 bzw. 2.3.5 angegeben. Durch Zugabe von 1 mM IPTG konnte die Überexpression des jeweiligen Enzymproteins induziert werden. Auf dem 12%-SDS-Gel war eine deutliche Vergrößerung der Proteinbande zu erkennen, die im Falle der HSS ca. 20 %, im Falle der DHS ca. 30 % des Gesamtproteins ausmachte. Bei beiden Expressionsstämmen, vor allem aber bei dem DHS-Expressionsstamm, konnte auch ohne Zugabe von IPTG eine leicht erhöhte Expression des HSS- bzw. DHS-Gens festgestellt werden („Lecken“ des Vektors) (Abb. 3.8).

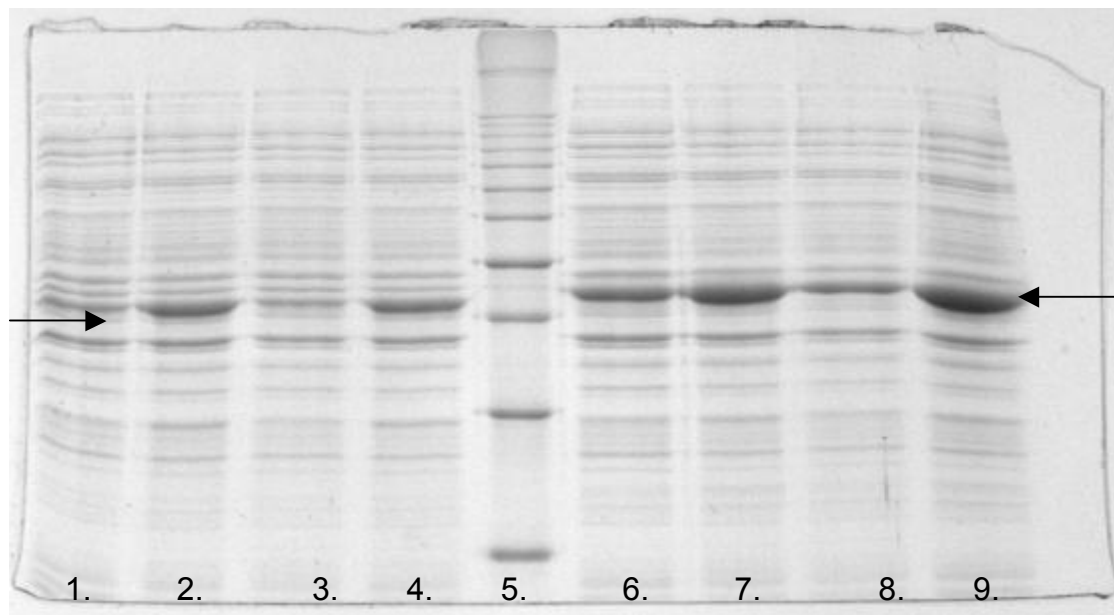


Abb. 3.8 Expression der rekombinanten HSS und DHS von *S. vernalis*. Jeweils 10 μ l der Bakterienkultur wurden vor und nach der Expression auf ein 12 %-SDS-Gel aufgetragen. Die Pfeile geben die Position der HSS- (links) bzw. DHS-Untereinheiten (rechts) bei ca. 41 bzw. 44 kDa im Gel an. Auf Bahn 5 wurde zum Größenvergleich die 10 kDa-Proteinleiter aufgetragen. Die Gelfärbung erfolgte mit Coomassie nach 2.14.

Bahn 1: HSS, nicht induziert
 Bahn 2: HSS, induziert
 Bahn 3: HSS, nicht induziert
 Bahn 4: HSS, induziert
 Bahn 5: 10 kDa-Proteinleiter

Bahn 6: DHS, nicht induziert
 Bahn 7: DHS, induziert
 Bahn 8: DHS, nicht induziert
 Bahn 9: DHS, induziert

Um in Versuchen mit rekombinanter HSS und DHS enzymatische Aktivität eindeutig einem der beiden Enzyme zuordnen bzw. Fremdaktivitäten durch bakterielle Begleitproteine ausschließen zu können, war es erforderlich, die DHS und die HSS in hochreiner Form einzusetzen, wobei die erzielte Proteinausbeute nur eine untergeordnete Rolle spielte. Ein von OBER (1997) etabliertes Verfahren hatte sich bereits bei der Reinigung der HSS aus WOK von *Senecio vernalis* bewährt:

Sephadex-G25 (Entsalzung des Rohextrakts durch Gelfiltration)

DEAE-Fractogel (NaCl-Gradient)

Phenylsepharose (hydrophobe Interaktionschromatographie)

DEAE-Fractogel (pH-Gradient)

Spermidin-Sepharose + Superdex 200 HR 10/30

Mono-Q

Nach dieser Prozedur lag die HSS in SDS-gelelektrophoretisch reiner Form vor. Das Reinigungsverfahren wurde in modifizierter Form auch für die Reinigung der beiden rekombinanten Enzyme verwendet (OBER und HARTMANN, 1999b). Die Entsalzung des rekombinanten bakteriellen Rohextrakts mit Gelfiltration war nicht erforderlich, da es keine niedermolekularen pflanzlichen Phenole abzutrennen gab, die einen raschen Aktivitätsverlust des Enzyms herbeigeführt hätten. Da der 4. Schritt (DEAE-Fractogelsäule mit pH-Elution) keine große Verbesserung der Enzymreinheit brachte (OBER, 1997) und der 5. Schritt (Spermidin-Sepharose-Affinitätschromatographie + Superdex 200 HR 10/30) die Enzymlösung mit Spermidin verunreinigt hätte, was besonders bei Experimenten, die die vollständige Abwesenheit von Spermidin im Reaktionsansatz erforderten, vermieden werden sollte, wurden beide rekombinanten Proteine über ein dreistufiges Verfahren aufgereinigt (2.9.4 bzw. 2.9.5):

DEAE-Fractogel-Anionenaustauscher

Phenylsepharose (HIC)

Mono-Q-Anionenaustauscher

DEAE-Fractogel Anionenaustauscher: Von dieser Anionenaustauschersäule mit einem Volumen von 8 ml wurden die Enzyme mit einem flachen NaCl-Gradienten von 0-0,2 M NaCl über 100 ml eluiert. Da sich bereits NaCl in der Enzymlösung befand, bot sich als nächster Schritt die Reinigung über die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) Phenylsepharose an. Es wurde eine Säule mit einem Volumen von 30 ml verwendet. Das Eluat der vorangegangenen Reinigung wurde auf eine NaCl-Konzentration von 1,5 M eingestellt. Unter diesen Bedingungen interagierten die unpolaren Aminosäurereste des Enzyms mit dem ebenfalls unpolaren Säulenmaterial. Die Elution des Enzyms erfolgte durch Absenkung der NaCl-Konzentration über einen Gradienten von 0,6 – 0 M NaCl über 100 ml. Da die vereinigten aktiven Fraktionen durchschnittlich noch 0,4 M NaCl enthielten, war vor dem Auftragen der Probe auf die Mono-Q-Anionenaustauschersäule eine Entsalzung

der Enzymlösung erforderlich. Durch mehrfaches Einengen der proteinhaltigen Fraktionen und Auffüllen mit NaCl-freiem Puffer konnte die NaCl-Konzentration auf unter 50 mM gesenkt werden (2.9.2). Der letzte Schritt, die Reinigung des Enzyms über die Mono-Q-Anionenaustauschersäule mit einem Volumen von 1 ml, wurde durch einen flach ansteigenden NaCl-Gradienten erzielt. Sowohl die DHS als auch die HSS eluierten im Bereich von 0,1-0,2 M NaCl. Die Untersuchung der Elutionsfraktionen beider Enzyme auf dem SDS-Gel (2.12) ergab, daß die meisten Elutionsfraktionen nur das jeweilige rekombinante Protein enthielten. Die reinen Fraktionen wurden vereinigt, auf den Glycin-/NaOH-Puffer, pH 9,25 umgepuffert und in Aliquots von je 500 µl bei -80°C gelagert. Es konnten auf diese Weise aus jeweils 500 ml LB-Flüssigmedium 11 mg reine DHS bzw. 9 mg reine HSS für die weiteren Untersuchungen gewonnen werden (s. Reinigungstabelle 3.2 und 3.3, sowie Abb. 3.12 und 3.16). Die folgenden Abbildungen 3.9, 3.10 und 3.11 zeigen die Elutionsprofile der DHS-Reinigung, die Abbildungen 3.13, 3.14 und 3.15 zeigen die Elutionsprofile der HSS.

Der bakterielle Rohextrakt nach Induktion (Abb. 3.12 Bahn 1) lässt ein breites Proteinspektrum mit der DHS als Hauptbande erkennen. Durch die drei Reinigungsschritte konnte das Protein erfolgreich von den kontaminierenden Proteinen abgetrennt werden. Der geringe Reinigungsfaktor von 3,3 (Tab. 3.2) ist mit dem hohen Aktivitätsverlust des Enzyms bei der Reinigung (ca. 75%) zu erklären, zeigt aber auch gleichzeitig die hohe Effizienz der DHS-Expression in *E.coli*. Auch bei der Expression der HSS konnte in Abb. 3.16, Bahn 1 ein breites Proteinspektrum mit der HSS als Hauptbande beobachtet werden (ca 20% des Gesamtproteins). Die angewendete Drei-Schritt-Reinigung war hier ebenfalls erfolgreich, jedoch mußte auch hier zugunsten der Reinheit des Enzyms eine vergleichsweise geringe Ausbeute in Kauf genommen werden. Der Aktivitätsverlust des Enzyms durch die Reinigung von ca. 90% war bei der HSS noch höher als bei der DHS. Deshalb lag der ermittelte Reinigungsfaktor nur bei 1,8 (Tab. 3.3).

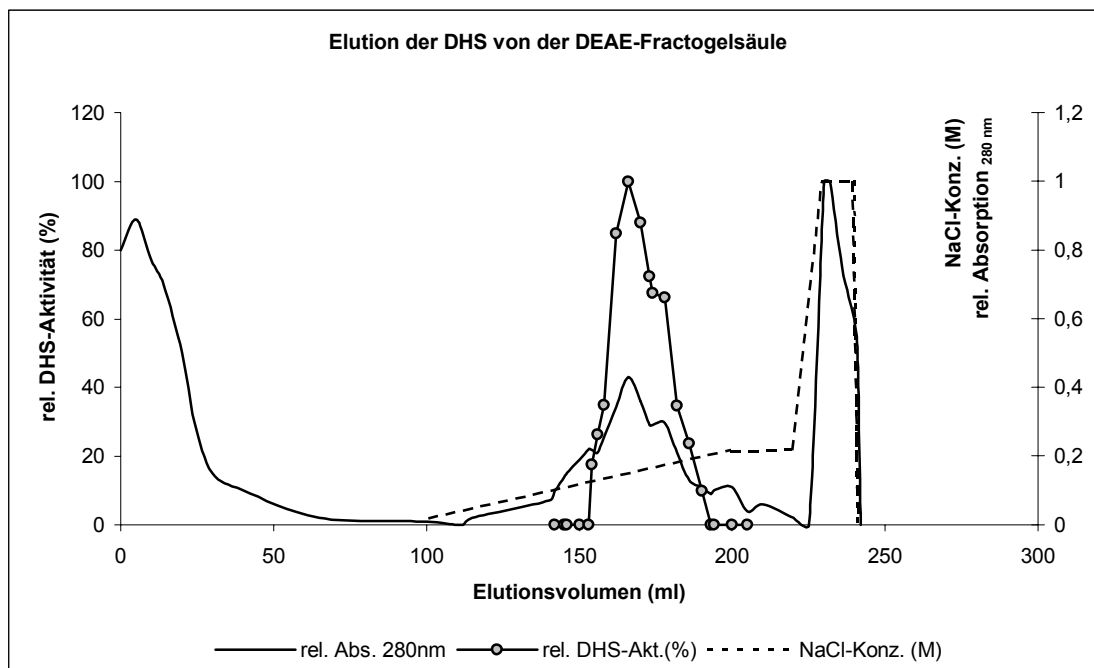


Abb. 3.9 Profil der DHS-Elution von der DEAE-Fractogel-Anionenaustauschersäule

Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wurde auf 2,0 eingestellt. Fraktionen zu je 4 ml wurden gesammelt und nach 2.6.1 auf HSS-Aktivität getestet. Die DHS eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,1 – 0,2 M. Die im Diagramm dargestellten relativen HSS-Aktivitäten resultieren aus der 15 min Inkubation im HSS-Schnelltest nach 2.6.1. Diese Ansätze enthielten nur 100 µM Put, weshalb auch in weniger aktiven Fraktionen schon nach 15 min ein deutlich sichtbarer Umsatz des Putrescins erfolgt war. Diese Werte ließen sich nur bedingt miteinander vergleichen, waren für einen halbquantitativen Nachweis der Enzymaktivität jedoch ausreichend. Nur die aktivsten Fraktionen (insgesamt 24 ml) wurden vereinigt, auf eine NaCl-Konzentration von 1,5 M eingestellt und mit dem Superloop auf die Phenylsepharose-Säule aufgetragen.

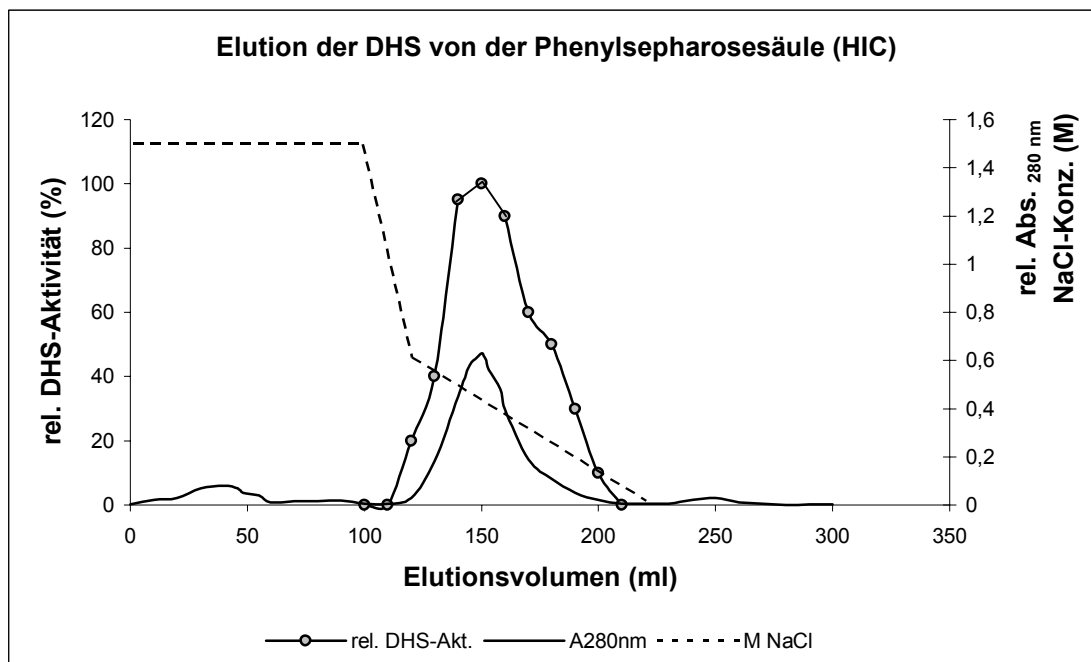


Abb. 3.10 Profil der DHS-Elution von der Phenylsepharose-Säule (HIC)

Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wurde auf 2,0 eingestellt, woraus die relativ kleinen Absorptionswerte des Proteins resultieren. Fraktionen zu 10 ml wurden gesammelt und nach 2.6.1 auf HSS-Aktivität getestet. Die im Diagramm dargestellten relativen HSS-Aktivitäten resultierten aus der 15 min Inkubation in Ansätzen mit nur 100 μ M Put, weshalb auch in weniger aktiven Fraktionen schon nach 15 min ein deutlich sichtbarer Umsatz des Putrescins erfolgt war. Diese Werte ließen sich nur bedingt miteinander vergleichen, waren für einen halbquantitativen Nachweis der Enzymaktivität jedoch ausreichend. Die DHS eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,6 – 0 M über 100 ml. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, in einer Amicon-Rührzelle mit 30-kDa-Membran entsalzt, auf 25 ml eingengt und mit dem Superloop auf die Mono-Q-Anionenaustauschersäule aufgetragen.

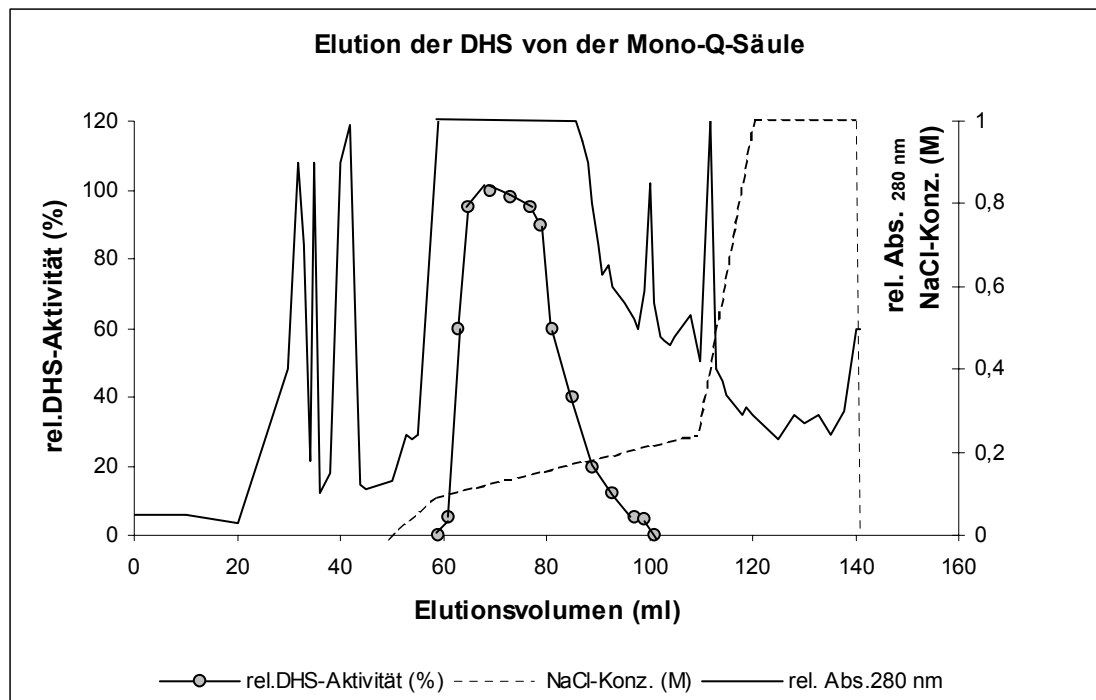


Abb. 3.11 Profil der DHS-Elution von der Mono-Q-Anionenaustauschersäule

Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wurde auf 0,5 eingestellt. Daher erreicht die Absorptionslinie im Bereich des DHS-Peaks den oberen Anschlag. Die starken Absorptionsschwankungen im Bereich von 20 – 40 ml werden durch kurz hintereinander eluierende Proteine verursacht. Fraktionen zu 2,0 ml wurden gesammelt und im Schnelltest nach 2.6.1 auf HSS-Aktivität getestet. Die DHS eluierte zwischen 0,1 – 0,2 M NaCl. Die im Diagramm dargestellten relativen HSS-Aktivitäten resultieren aus der 15 min Inkubation im HSS-Schnelltest nach 2.6.1. Diese Ansätze enthielten nur 100 μ M Put, weshalb auch in weniger aktiven Fraktionen schon nach 15 min ein deutlich sichtbarer Umsatz des Putrescins erfolgt war. Diese Werte ließen sich nur bedingt miteinander vergleichen, waren für einen halbquantitativen Nachweis der Enzymaktivität jedoch ausreichend. Aliquots der aktiven Fraktionen wurden auf ein 12 %-SDS-Gel aufgetragen und nach 2.12 elektrophoretisch getrennt. Die Fraktionen, die nur das gereinigte DHS-Protein enthielten, wurden vereinigt, auf den Standardpuffer (pH 9,25) umpuffert, aliquotiert und bei – 80°C gelagert.

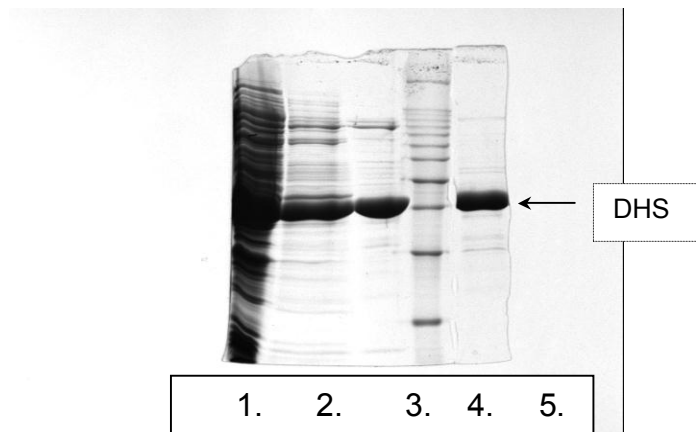


Abb. 3.12 12%-SDS-Gel der einzelnen Reinigungsstufen der säulenchromatographischen DHS-Reinigung. Es wurden Aliquots von 10 μ l der vereinigten enzymhaltigen Elutionsfraktionen vor dem jeweils nächsten Reinigungsschritt entnommen. (Ausnahme: Bahn 5 zeigt nur eine Elutionsfraktion der Mono-Q-Reinigung stellvertretend für alle anderen reinen Fraktionen. Zur Detektion der Proteine wurde das Gel mit einer Coomassie-Färbelösung nach 2.14 angefärbt.

Bahn 1.: Rohextrakt

Bahn 2.: DEAE-Fractogel-Eluat

Bahn 3.: Phenylsepharose-Eluat (HIC)

Bahn 4.: 10 kDa-Proteinleiter

Bahn 5.: Mono-Q-Eluat

Reinigungsstufe	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (nkat)	spezifische Aktivität (nkat/mg)	Reinigungsfaktor	Ausbeute
entsalzter Rohextrakt	130,2	30,24	0,232	1	100%
homogenes Protein	10,94	8,39	0,767	3,3	27,7%

Tab. 3.2 Reinigungstabelle der säulenchromatographischen Aufreinigung der rekombinanten DHS aus *S. vernalis*. Die HSS-Aktivität wurde im HSS-Standardinkubationsansatz nach 2.6.1 bestimmt.

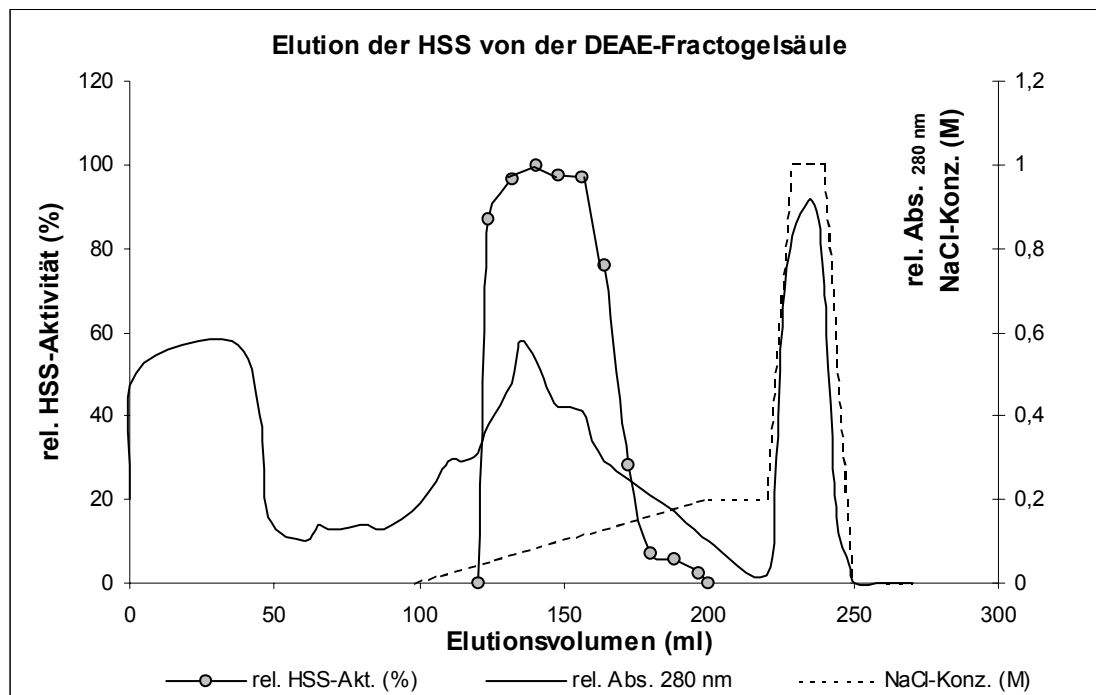


Abb. 3.13 Profil der HSS-Elution von der DEAE-Fractogel-Anionenaustauschersäule

Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wurde auf 2,0 eingestellt. Es wurden Fraktionen zu 4 ml gesammelt und nach 2.6.1 im Schnelltest auf HSS-Aktivität getestet. Die im Diagramm dargestellten relativen HSS-Aktivitäten lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen, da bei einer Put-Konzentration von 100 μM im Puffer auch bei weniger aktiven Fraktionen schon nach 15 min ein Großteil des Substrats umgesetzt worden war. Für eine exakte quantitative Bestimmung der Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen taugten die Werte nur bedingt, jedoch waren sie ausreichend zum halbquantitativen Nachweis des Enzyms. Die HSS eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,05 – 0,15 M. Die aktivsten Fraktionen (32 ml), wurden vereinigt, mit feingemörsertem NaCl auf einen Salzgehalt von 1,5 M eingestellt und per Superloop auf die Phenylsepharose-Säule (HIC) aufgetragen.

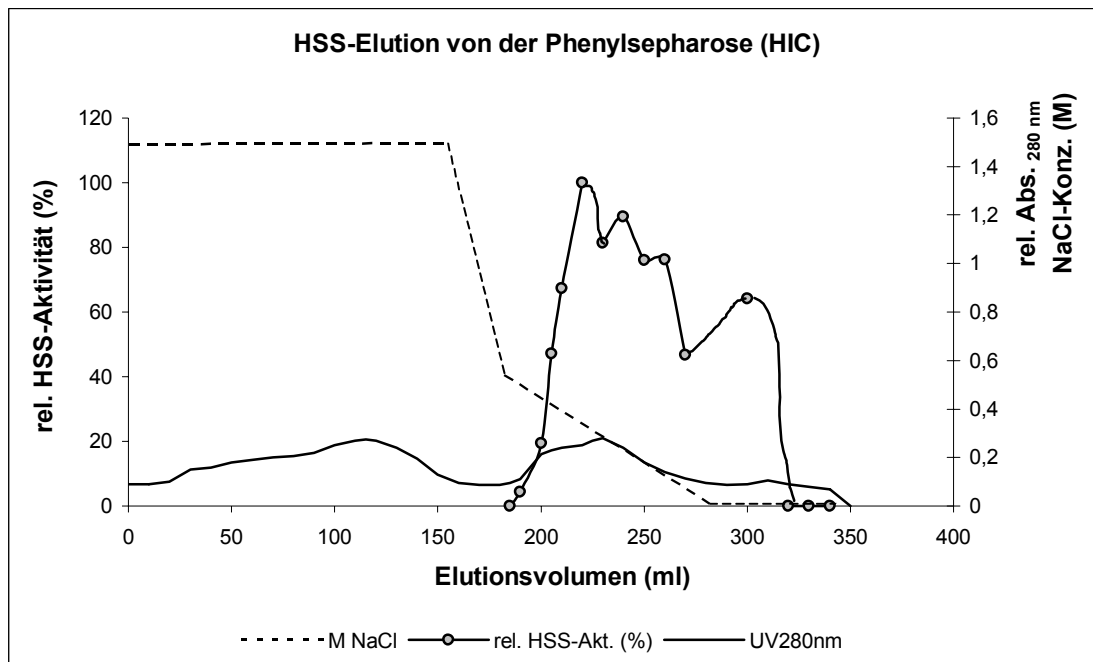


Abb. 3.14 Profil der HSS-Elution von der Phenylsepharose-Säule (HIC)

Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wurde auf 2,0 eingestellt, weshalb die Absorption durch Proteine nur sehr gering ist. Fraktionen zu je 10 ml wurden gesammelt und nach 2.6.1 im Schnelltest auf HSS-Aktivität getestet. Die im Diagramm dargestellten relativen HSS-Aktivitäten lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen, da bei einer Put-Konzentration von 100 μ M im Puffer auch in weniger aktiven Fraktionen schon nach 15 min ein Großteil des Substrats umgesetzt worden war. Für eine exakte quantitative Bestimmung der Enzymaktivität der einzelnen Fraktionen taugten die ermittelten Werte nur bedingt, jedoch waren sie ausreichend zum halbquantitativen Nachweis des Enzyms. Die HSS eluierte bei einem Salzgehalt von 0,5 – 0 M über 150 ml. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, entsalzt, auf 16 ml eingengt und per Superloop auf die Mono-Q-Anionenaustauschersäule aufgetragen.

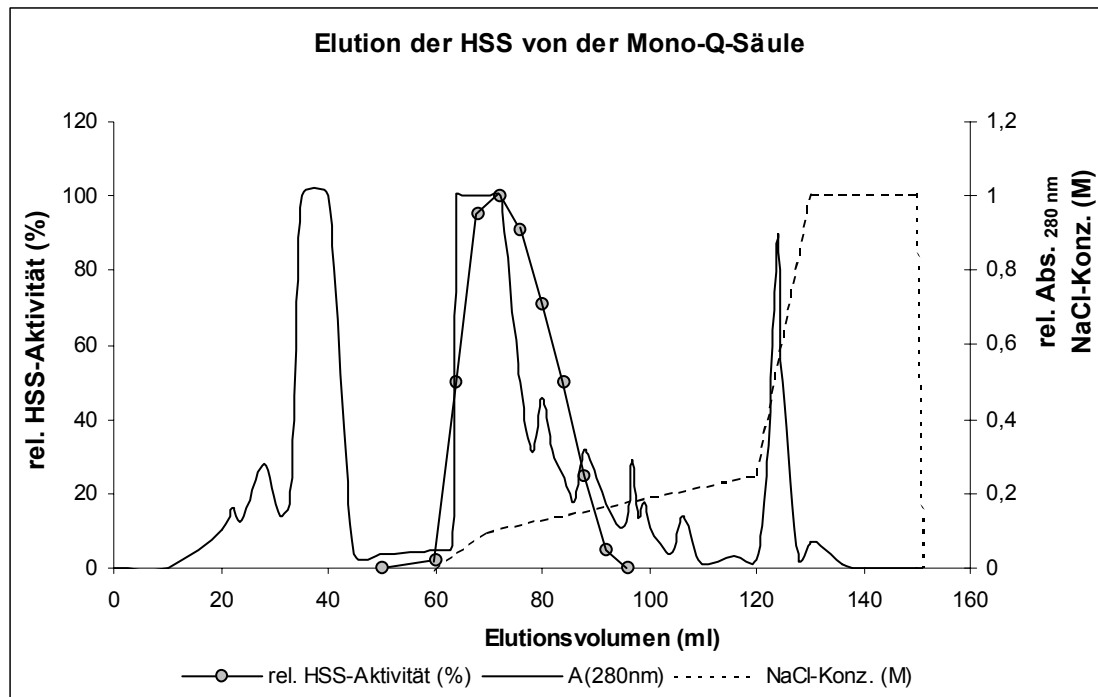


Abb. 3.15 Profil der HSS-Elution von der Mono-Q-Anionenaustauschersäule

Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wurde auf 0,5 eingestellt, weshalb die Absorption im Bereich des HSS-Peaks den oberen Anschlag erreicht. Die im Diagramm dargestellten relativen HSS-Aktivitäten lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen, da bei einer Put-Konzentration von 100 μM im Puffer auch in weniger aktiven Fraktionen schon nach 15 min ein Großteil des Substrats umgesetzt worden war. Für eine quantitative Bestimmung der Enzymaktivität der einzelnen Fraktionen taugten die ermittelten Werte nur bedingt, jedoch waren sie ausreichend zum halbquantitativen Nachweis des Enzyms. Die HSS eluierte bei einer Salzkonzentration von 0 – 0,15 M. Die aktiven Fraktionen wurden im 12 % SDS-Gel nach 2.12 auf Reinheit geprüft. Die reinen Fraktionen wurden vereinigt, auf den Standardpuffer (pH 9,25) umgepuffert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

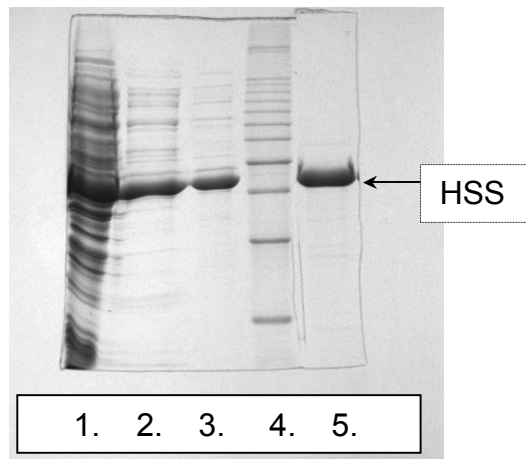


Abb. 3.16 12%-SDS-Gel der säulenchromatographischen HSS-Reinigung. Es wurden Aliquots von je 10 μ l aus den vereinigten enzymhaltigen Fraktionen vor dem jeweils nächsten Reinigungsschritt entnommen und elektrophoretisch getrennt (Ausnahme: Bahn 5 enthält das Aliquot aus nur einer HSS-haltigen Fraktion stellvertretend für alle anderen reinen Fraktionen der Mono-Q-Anionenaustauscherreinigung). Bahn 4 enthält zum Größenvergleich die Standardproteine der 10 kDa-Proteinleiter

Die Proteinbanden im 12%-SDS-Gel wurden nach Auftrennung mit einer Coomassie-Färbelösung nach 2.14 eingefärbt.

Bahn 1.: Rohextrakt

Bahn 2.: DEAE-Fractogel-Anionentauscher-Eluat

Bahn 3.: Phenylsepharose-Eluat (HIC)

Bahn 4.: 10 kDa-Proteinleiter

Bahn 5.: Mono-Q-Anionenaustauscher-Eluat

Reinigungsstufe	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (nkat)	spezifische Aktivität (nkat/mg)	Reinigungsfaktor	Ausbeute
entsalzter Rohextrakt	142,1	63,85	0,449	1	100%
homogenes Protein	7,51	5,88	0,784	1,8	9,2%

Tab. 3.3 Reinigungstabelle der säulenchromatographischen Aufreinigung der rekombinanten HSS aus *S. vernalis*.

3.5 Synthese von Homospermidin

Für die Experimente mit der DHS und HSS war es erforderlich, das Produkt der HSS-Reaktion, Homospermidin, in mg-Mengen herzustellen. Zur enzymatischen Präparation des Homospermidin mit Hilfe der HSS aus *Rhodopseudomonas viridis* wurde ein entsalzter Rohextrakt des rekombinanten Enzyms verwendet (2.5.4). Das Substrat Putrescin wurde durch das Enzym sehr effizient zu Homospermidin umgesetzt, die Ausbeuten lagen bei 75 %. Zur Abtrennung von nicht umgesetztem Putrescin wurde der saure Kationenaustauscher Dowex 50 W verwendet. Im Gegensatz zu Angaben von GRASER (1997) konnte mit 1,65 N HCl Putrescin nicht selektiv vom Austauscherharz heruntergewaschen werden, da Homospermidin unter diesen Bedingungen ebenfalls eluierte. Erst durch Verringerung der Säurekonzentration auf 1,4 N HCl gelang es, Putrescin vollständig von Homospermidin abzutrennen. Homospermidin wurde erschöpfend mit 3 N HCl eluiert. Die Methode fand Anwendung sowohl bei der Herstellung des radioaktiv markierten Homospermidins als auch bei der Herstellung des unmarkierten Homospermidins. Ebenso wie Homospermidin ließ sich auch Spermidin mit derselben Säurestärke von Putrescin trennen. Abb. 3.17 zeigt das Elutionsdiagramm eines Testgemisches von 15 µmol Putrescin und 10 µmol Spermidin.

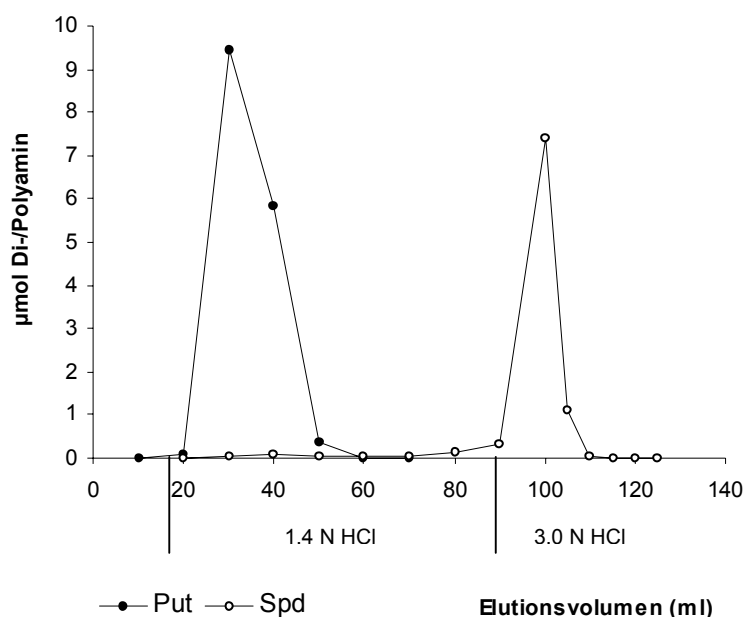


Abb. 3.17 Trennung eines Testgemisches von Putrescin und Spermidin über sauren Kationentauscher Dowex 50 W. 1 ml der in 0,1 N HCl gelösten Di- bzw. Polyaminhydrochloride (15 μ mol Putrescin, 10 μ mol Spermidin) wurden mit einer Niederdruckpumpe (0,7 ml/min) auf 1 ml des neutral gewaschenen Austauscherharzes aufgebracht. Es wurde mit 20 ml 0,2 N HCl nachgespült, anschließend mit 70 ml 1,4 N HCl das Putrescin vollständig eluiert. Danach erfolgte die Elution des Spermidins mit 40 ml 3 N HCl. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 10 bzw. 5 ml aufgefangen und die Polyamingehalte mit HPLC nach 2.5.1 bestimmt.

3.6 Qualitative und quantitative Bestimmung der benzoylierten Polyamine

Die qualitative Analyse und Quantifizierung der benzoylierten Polyamine durch HPLC wurde nach der Methode von REDMOND und TSENG (1979) bei einer Wellenlänge von 230 nm durchgeführt (2.5.1). Cadaverin (1,5-Diaminopentan) diente als interner Standard. Die Identifizierung der Di- und Polyamine erfolgte durch Cochromatographie und Vergleich der Retentionszeiten. Bei einer Detektorempfindlichkeit von 0,02 lieferten gleiche molare Mengen Putrescin und Cadaverin gleich große Signale, während für das Triamin Spermidin aufgrund des höheren Benzoylierungsgrades ein 1,4-fach (theoretisch 1,5-fach) größeres Signal ermittelt wurde. Homospermidin als Homologes des Spermidins, wurde ebenfalls mit

dem Korrekturfaktor 1,4 gegenüber Putrescin und Cadaverin berechnet. In einem Bereich von 5–250 nmol waren Stoffmenge und Detektorsignal (Extinktion) zueinander proportional (Abb. 3.18). Abb. 3.19 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm benzoylierter Di- und Triamine mit UV-Detektion bei 230 nm.

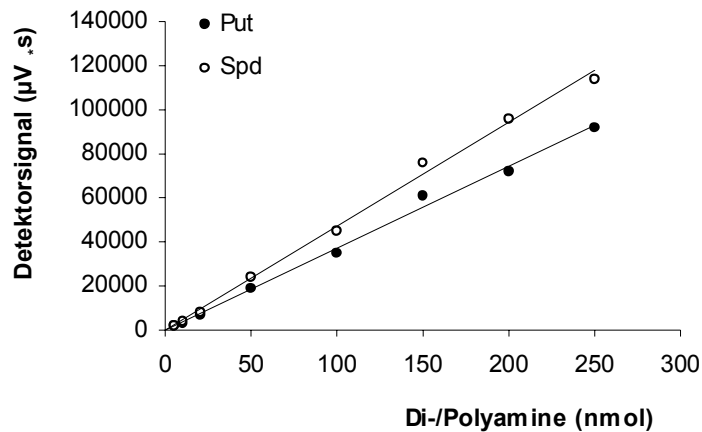


Abb. 3.18 Verhältnis von Signal zu Stoffmenge der benzoylierten Di- und Polyamine am Beispiel von Putrescin und Spermidin nach HPLC-Trennung. Erklärung im Text

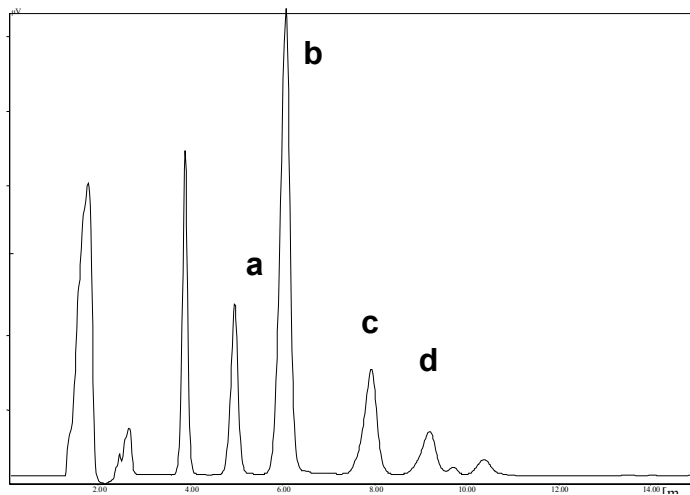


Abb. 3.19 Trennung von Di- und Polyaminen mit HPLC nach 2.5.1. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 230 nm. Fließmittel: 60% H_3PO_4 , 1,5%, 40% Acetonitril, Flußrate: 1,0 ml/min; Peaks: a) Putrescin: 5,1 min, b) Cadaverin (interner Standard): 6,1 min, c) Spermidin: 8,0 min, d) Homospermidin: 9,2 min

3.7 Die pflanzliche HSS verwendet Putrescin nicht als Aminobutyldonor

Die bakterielle HSS aus *Rhodopseudomonas viridis* stellt aus zwei Molekülen Putrescin ein Molekül Homospermidin her. Putrescin dient bei dieser Reaktion sowohl als Aminobutyldonor als auch als Aminobutylakzeptor, wobei Spermidin ersatzweise als Aminobutyldonor dienen kann. Es sollte überprüft werden, ob auch die pflanzliche HSS aus *S. vernalis* anstelle von Spermidin als Aminobutyldonor Putrescin verwenden kann. Dazu wurde die HSS in Gegenwart von $[^{14}\text{C}]$ Putrescin mit und ohne Spermidin inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.20 wiedergegeben. Es zeigt eindeutig, dass im Ansatz ohne Spermidin kein Homospermidin gebildet wurde. Damit war klar, dass im Gegensatz zur bakteriellen HSS die pflanzliche HSS auf Spermidin als Aminobutyldonor angewiesen ist. Das Ergebnis überraschte, denn BÖTTCHER (1994) hatte in seiner Arbeit mit teilgereinigter HSS in Ansätzen, die allein Putrescin enthielten, Homospermidin-Bildung beobachtet. Allerdings hatte er zur Stabilisierung des Enzyms bei der Reinigung einen spermidinhaltigen Puffer verwendet. Eine Isolierung und Reinigung des Enzyms gelang damals nur in Gegenwart von Spermidin. Trotz Abreicherung des Spermidins durch mehrfaches Entsalzen und Umpuffern der Lösung blieb vermutlich so viel Spermidin im Puffer,

dass es als Aminobutyldonor dienen konnte. Zum damaligen Zeitpunkt bestand kein Grund, an einer Funktion des Putrescins als Aminobutyldonor zu zweifeln. Das Ergebnis zeigte, dass sich die pflanzliche und bakterielle HSS nicht nur genetisch, sondern auch in ihrer Substratspezifität unterscheiden.

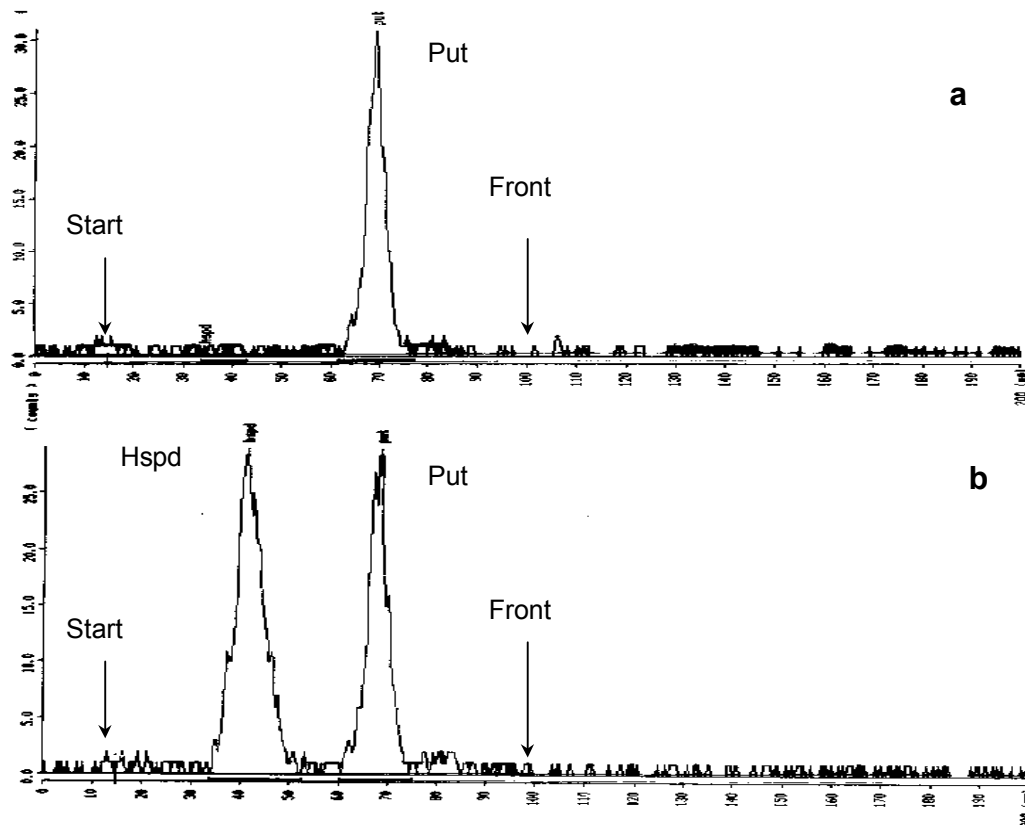


Abb. 3.20 Radio-Dünnschichtchromatogramm eines HSS-Standardinkubationsansatzes mit a) 400 μM [^{14}C]Putrescin und b) 400 μM [^{14}C]Putrescin und 400 μM Spermidin. Nach der DC-Trennung über eine Laufstrecke von 85 mm erfolgte die Auswertung mit der Radio-DC-Software der Fa. Raytest nach 2.6.1. In Ansatz a ohne Spermidin konnte, im Gegensatz zur Kontrolle b, keine Homospermidin-Bildung beobachtet werden. Retentionsindices der detektierten Amine: Homospermidin: 0,28, Putrescin: 0,57.

3.8 Ermittlung des pH-Optimums von DHS und HSS aus *S. vernalis*

Um für beide Enzyme vergleichbare Bedingungen zur Durchführung der Experimente zu schaffen, sollte ein Puffer ausgewählt werden, in dem sowohl die DHS als auch die HSS zufriedenstellend arbeitet. In der Literatur wurden zur Aktivitätsbestimmung der DHS aus verschiedenen Organismen Glycin-NaOH-Puffer (pH 8,6 - 10,6) verwendet (TAO und CHEN, 1995). Da sowohl die pflanzliche DHS als auch die HSS im Glycin-NaOH-Puffer gute HSS-Aktivität zeigten, wurde dieser Puffer für beide Enzyme verwendet. Um das pH-Optimum im Glycin-NaOH-Puffer für die HSS-Reaktion von DHS und HSS zu ermitteln, wurden Standardinkubationsansätze nach 2.6.1 bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert und die Aktivität der Enzyme ermittelt. Beide Enzyme zeigten ein pH-Optimum von 9,25 (Abb. 3.21). Alle weiteren Versuche wurden bei diesem pH-Wert im Glycin-NaOH-Puffer durchgeführt.

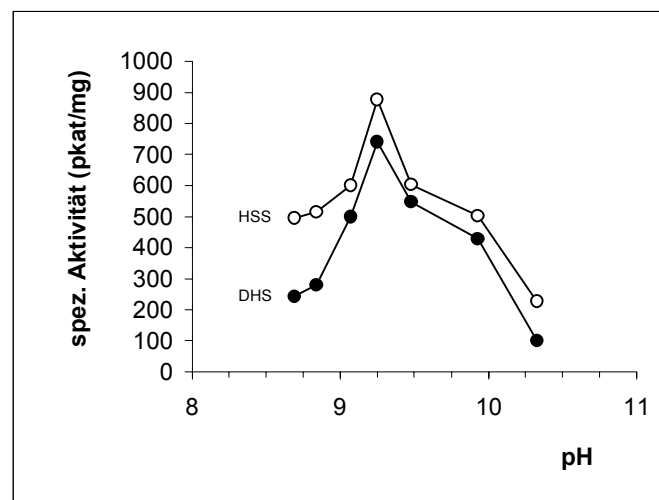


Abb. 3.21 pH-Optima von DHS und HSS im Glycin-NaOH-Puffer. Die spezifischen Aktivitäten wurden im Standardinkubationsansatz nach 2.6.1 (HSS-Assay) ermittelt. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 15 min, die Auswertung mit Radio-DC.

3.9 Ermittlung der Wechselzahl (turnover-number) der DHS- und HSS-katalysierten Reaktionen

Nach der Reinigung der DHS und HSS bis zur elektrophoretischen Homogenität sollte die Wechselzahl beider Enzyme, d.h., die Anzahl der pro Zeiteinheit von einem Enzymmolekül umgesetzten Substratmoleküle, in der HSS- bzw. DHS-Reaktion bestimmt werden. In Inkubationsansätzen nach 2.6.1 bzw. 2.6.2 (Tab. 3.4) konnte eine Wechselzahl von $2,4 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ für die DHS im DHS-Assay, bzw. von $3,2 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ im HSS-Assay, sowie eine Wechselzahl von $3,2 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ für die HSS im HSS-Assay ermittelt werden. Im HSS-Assay arbeiten demnach beide Enzyme unter gleichen Bedingungen gleich effizient, während die DHS-Reaktion mit erheblich geringerer Geschwindigkeit verläuft.

	DHS		HSS
Aktivitätstest	DHS-Assay	HSS-Assay	HSS-Assay
Put / Spd / NAD^+ (μM)	-----	400/400/500	400/400/500
eIF5A / Spd / NAD^+ (μM)	40/40/1000	-----	-----
Enzymmenge (μg)	0,46	3,65	2,35
spez. Aktivität v (pkat/mg)	57,6	766,8	783,6
Größe / Untereinheit (kDa)	41,4	41,4	40,7
Wechselzahl (s^{-1})	$2,4 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{-2}$

Tab. 3.4 Bestimmung der Wechselzahl der DHS im DHS- und HSS-Assay und der HSS im HSS-Assay. Die Aktivitätstests erfolgten nach 2.6.1 (HSS-Assay) bzw. 2.6.2 (DHS-Assay).

3.10 Homospermidin ist Produkt und Substrat von DHS und HSS

Da sich in Vorversuchen zur Substratspezifität der HSS und DHS Hinweise ergeben hatten, dass Homospermidin Spermidin als Aminobutyldonor ersetzen kann, wurden Experimente mit radioaktiv markiertem Putrescin in Gegenwart von nicht markiertem Spermidin und Homospermidin durchgeführt. Ein weiterer Ansatz enthielt [^{14}C]Spermidin in Gegenwart von nicht markiertem Putrescin. In beiden Tracern waren jeweils die C-Atome 1 und 4 der Aminobutyleinheit markiert (Abb. 3.22), so

dass die Versuche den Transfer der Aminobutyleinheiten zwischen dem jeweiligen Donor und Akzeptor widerspiegeln sollten. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze A, B und C ist in Tabelle 3.5 wiedergegeben. Die Reaktion wurde kontinuierlich über die Zeit verfolgt. In Ansätzen, in denen neben markiertem Homospermidin markiertes Spermidin zu erwarten war, wurden in regelmäßigen Abständen 50 µl-Aliquots entnommen, nach 2.6.1 benzoyliert und die Benzamide über HPLC mit Radiodetektion aufgetrennt und analysiert. In Ansätzen, in denen kein Spermidin zu erwarten war (Ansatz B, Tab. 3.5), konnte die Auftrennung und Auswertung mit DC erfolgen. Hierzu wurden 10 µl-Proben entnommen und sofort auf eine bereitliegende DC-Platte aufgetragen.

	A	B	C
¹⁴ C-Substrat	[¹⁴ C]Put	[¹⁴ C]Put	[¹⁴ C]Spd
2. Substrat	Spd	Hspd	Put
Enzymaktivität	70 pkat	11 pkat	10 pkat
Gesamtvolumen	1000 µl	150 µl	300 µl
Inkubationsdauer	360 min	360 min	180 min

Tab. 3.5 Versuche mit HSS oder DHS im HSS-Inkubationsansatz. Die Ansätze A und B wurden mit beiden Enzymen durchgeführt, Ansatz C wurde nur mit DHS getestet. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit Radio-HPLC (A und C), bzw. Radio-DC (Ansatz B).

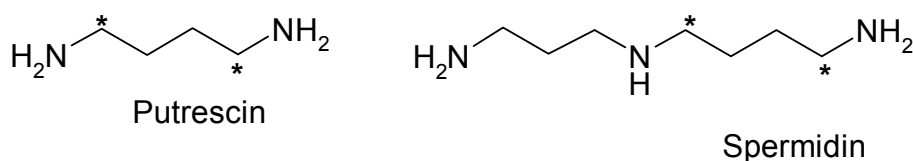


Abb. 3.22 Strukturformeln des [¹⁴C]-Putrescins und [¹⁴C]-Spermidins. Die Markierung „*“ gibt die Position der ¹⁴C-Isotopen im Molekül an.

Das Ergebnis des Versuchs A (Tab. 3.5) ist in Abb. 3.23 für beide Enzyme wiedergegeben. Wie zu erwarten nimmt die Menge an markiertem Putrescin ab, während die Menge an markiertem Homospermidin zunimmt. Hier wird die Aminobutylierung des markierten Putrescins durch nichtmarkiertes Spermidin deutlich. Auffällig ist, dass im Laufe der Inkubation auch markiertes Spermidin entsteht. Dies ist nur dadurch zu erklären, dass das mit der Zeit entstehende

markierte Homospermidin als Aminobutyldonor fungiert und seinen aus dem [^{14}C]Putrescin stammenden ^{14}C -markierten Aminobutylrest auf Diaminopropan überträgt, welches im Zuge der spermidinabhängigen Aminobutylierung von Putrescin entsteht. Die Umsetzungen werden durch beide Enzyme mit gleichem Zeitlauf katalysiert, die Aminobutylierung von Putrescin durch die DHS kommt etwas früher, d.h. nach etwa 100 Minuten zum Stillstand als die der HSS.

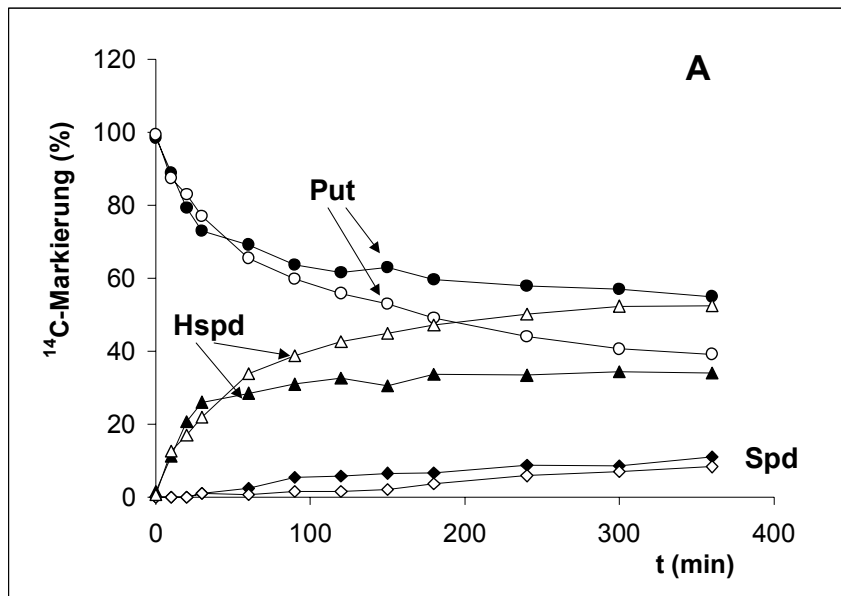


Abb. 3.23 Inkubation der DHS (schwarze Symbole) und HSS (weiße Symbole) mit [^{14}C]Putrescin und Spermidin, je 400 μM , 70 pkat Enzymaktivität in 1000 μl Gesamtvolumen. Die Analyse erfolgte mit der 100%-Methode durch die Radio-HPLC nach 2.5.1. Die ursprünglich nur im Putrescin vorhandene ^{14}C -Markierung wurde im Verlauf der Inkubation sowohl im neugebildeten Homospermidin als auch im Spermidin nachgewiesen.

Durch Ansatz B (Tab. 3.5) sollte geklärt werden, ob Homospermidin selbst wie vermutet Spermidin als Aminobutyldonor ersetzen kann. Abb. 3.24 gibt das Versuchsergebnis wieder. Sowohl DHS als auch HSS synthetisieren aus [^{14}C]Putrescin und Homospermidin schnell radioaktiv markiertes Homospermidin. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Art Rezyklisierung von Aminobutylresten zwischen Putrescin und Homospermidin. Für jedes Molekül Putrescin, das durch Aminobutylierung verbraucht wird, wird gleichzeitig auch ein Molekül Putrescin aus dem als Aminobutyldonor fungierenden Homospermidin gebildet. Bei der durch die DHS katalysierten Reaktion finden sich am Ende je ca. 50% der ursprünglich aus dem Putrescin stammenden markierten Aminobutylreste im Putrescin und im Homospermidin. Bei der HSS-katalysierten Reaktion beträgt der Anteil im

Homospermidin sogar 60%. Das bedeutet, dass einige Homospermidin-Moleküle zwei markierte Aminobutylreste besitzen. Insgesamt zeigt dieser Versuch, dass beide Enzyme mit hoher Effizienz Homospermidin anstelle von Spermidin als Aminobutyl donor verwenden können. Auch die in Ansatz A beobachtete Bildung von markiertem Spermidin wird nun klar verständlich, vorausgesetzt dass Diaminopropan Aminobutylakzeptor für eine homospermidinabhängige Aminobutylierung ist.

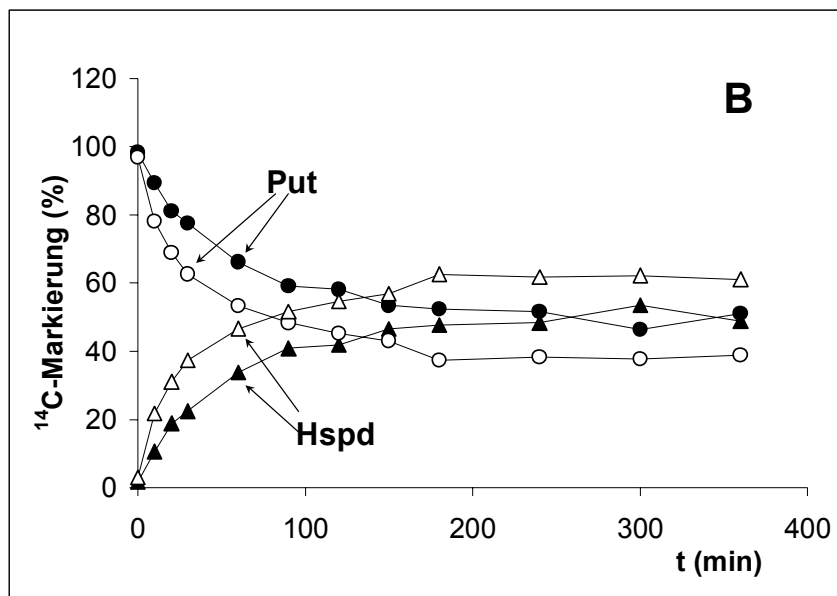


Abb. 3.24 Inkubation von je 11 pkat HSS (weiße Symbole) und DHS (schwarze Symbole) mit je 400 μM $[^{14}\text{C}]$ Putrescin und Homospermidin im 150 μl Gesamtansatz. Die Analyse erfolgte durch Radio-DC mit der 100%-Methode nach 2.5.1. Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung der radioaktiven Markierung in den Aminen. Im Verlauf der Inkubation konnte die ^{14}C -Markierung, die anfänglich nur im Putrescin vorlag, auch im Homospermidin detektiert werden, ein Beweis dafür, dass neben Spermidin auch Homospermidin als Aminobutyl donor fungierte.

Der Inkubationsansatz C (Tab. 3.5) mit $[^{14}\text{C}]$ Spermidin und nicht markiertem Putrescin wurde einerseits als Kontrolle zu Ansatz A durchgeführt. Andererseits sollte das Auftreten eines Metaboliten kinetisch genauer verfolgt werden, der in den Versuchen bei Inkubationen mit $[^{14}\text{C}]$ Spermidin jedoch nicht mit $[^{14}\text{C}]$ Putrescin beobachtet wurde. Da dieser Metabolit sowohl in Ansätzen mit DHS als auch mit HSS auftrat, aber in Ansätzen mit DHS stets in höheren Mengen gebildet wurde,

erfolgte die Inkubation mit der DHS. Abb. 3.25 gibt das Versuchsergebnis wieder. Im Verlauf der Inkubation nimmt, wie erwartet, der Gehalt an markiertem Spermidin um ca. 60% ab (Restgehalt nach 180 min ca. 40%). Etwa 38% der Markierung finden sich im Hspd wieder, weitere 7% im Putrescin und knapp 14% in dem unbekannten Metaboliten (X in Abb. 3.25). Aufgrund der Ergebnisse der vorausgegangenen Versuche konnte davon ausgegangen werden, dass das radioaktiv markierte Putrescin aus dem neugebildeten Hspd stammte, das zunehmend mit Spermidin als Aminobutyldonor konkurriert. Bei dem Metaboliten X, dessen Konzentration im Ansatz kontinuierlich zunahm, könnte es sich um ein Spermidinderivat handeln. Dafür könnte auch sprechen, dass es mit einer deutlich höheren Retentionszeit als Spermidin und Homospermidin im Säuleneluat erscheint (Abb. 3.26). Zur Identifizierung des Metaboliten X s. Kap. 3.12.

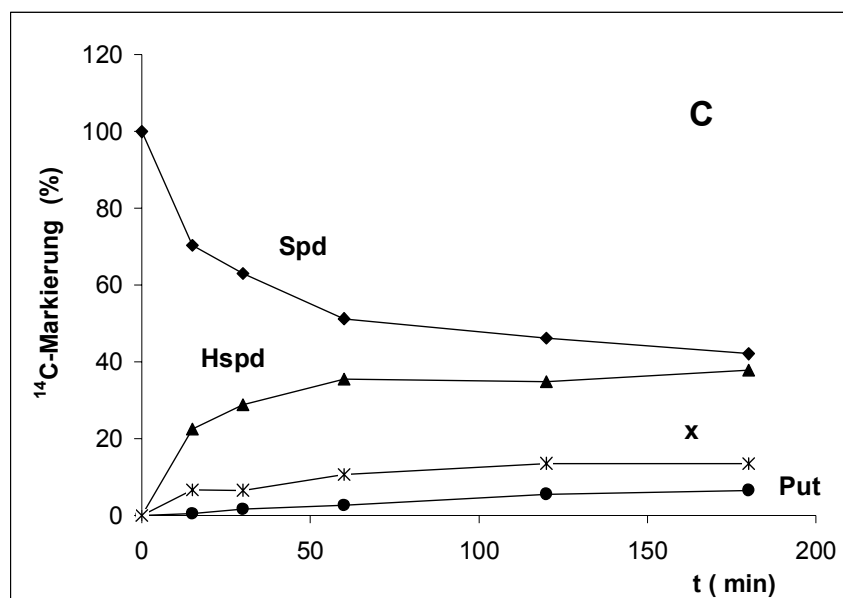


Abb. 3.25 Inkubationsansatz C der DHS mit [¹⁴C]Spermidin und Putrescin, je 400 μM, 10 pkat Enzymaktivität über 180 min. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit Radio-HPLC nach 2.5.1. Die ¹⁴C-Markierung aus dem Spermidin trat im Verlauf der Inkubation auch im Homospermidin, im Putrescin und im Produkt X auf.

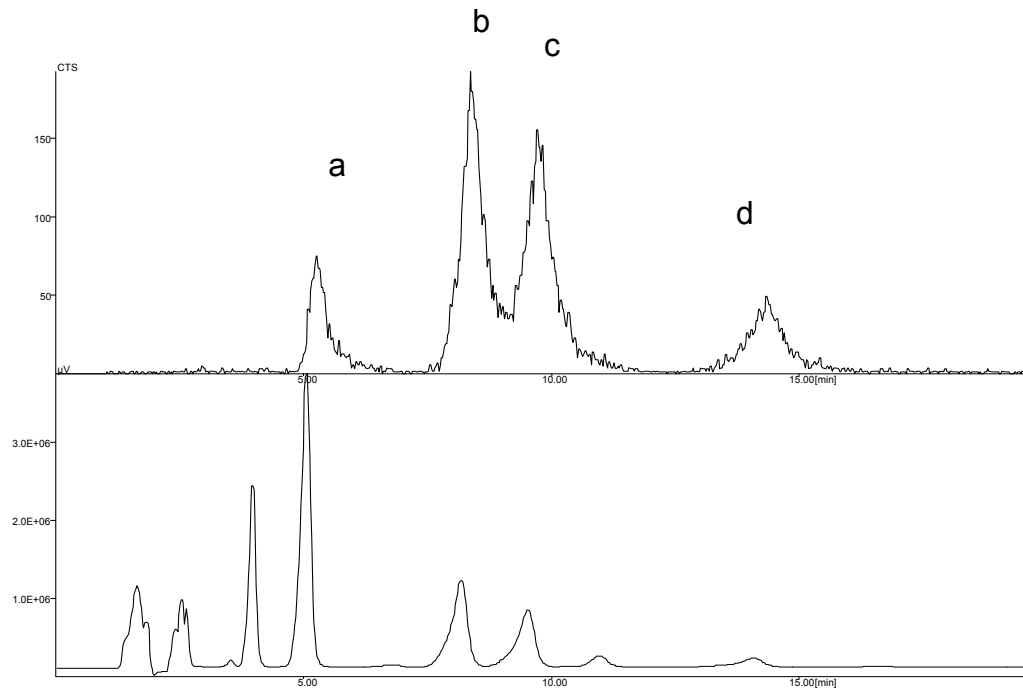


Abb. 3.26 Radio-HPLC-Chromatogramm der Reaktionsprodukte aus Ansatz C mit DHS nach 180 min. Die obere Hälfte des Chromatogramms zeigt die Verteilung der ^{14}C -Markierung im ^{14}C -Kanal, die untere Hälfte das UV-Chromatogramm bei 230 nm. Peak a: Putrescin, 5,1 min., b: Spermidin, 8,25 min., c: Homospermidin, 9,5 min., d: Produkt X, 13,8 min.

Nach dem überraschenden Befund, dass Homospermidin Spermidin als Aminobutyldonor ersetzen kann, war nun zu überprüfen, ob Homospermidin auch bei der Aminobutylierung des eIF5A Spermidin als Substrat ersetzen kann. Gleichzeitig sollte die HSS nochmals auf DHS-Aktivität überprüft werden. Die drei in Tab. 3.6 aufgeführten Ansätze mit eIF5A als Substrat wurden vorbereitet. Die ersten beiden Ansätze wurden mit DHS in Gegenwart von $[^{14}\text{C}]$ Spermidin als Substrat (DHS/Spd) bzw. in Gegenwart von $[^{14}\text{C}]$ Homospermidin (DHS/Hspd) durchgeführt, der dritte Ansatz mit HSS in Gegenwart von $[^{14}\text{C}]$ Spermidin als Substrat (HSS/Spd). Das Ergebnis der drei Versuche ist in Abb. 3.27 wiedergegeben. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Homospermidin Spermidin als Substrat in der DHS-Reaktion als Aminobutyldonor ersetzen kann. Für die HSS ließ sich, wie zu erwarten, auch nicht in Spuren DHS-Aktivität in Gegenwart von $[^{14}\text{C}]$ Spermidin nachweisen.

	DHS/Spd	DHS/Hspd	HSS/Spd
^{14}C -Substrat	$[^{14}\text{C}]\text{Spd}$, 10 μM	$[^{14}\text{C}]\text{Hspd}$, 10 μM	$[^{14}\text{C}]\text{Spd}$, 10 μM
eIF5A-Vorläuferprotein	12,5 μM	12,5 μM	12,5 μM
NAD^+	500 μM	500 μM	500 μM
Enzym	1 μg DHS	1 μg DHS	2,6 μg HSS

Tab. 3.6 Zusammensetzung der Inkubationsansätze mit DHS/HSS im DHS-Assay. Die Auswertung erfolgte nach 2.6.2.

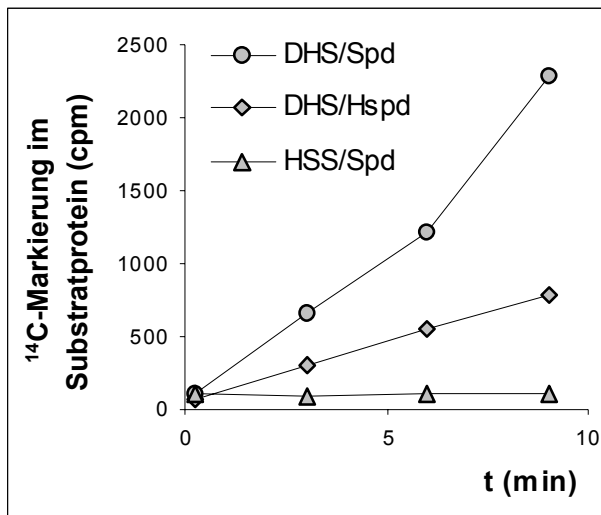


Abb. 3. 27 Inkubation von DHS mit $[^{14}\text{C}]\text{Spermidin}$ und $[^{14}\text{C}]\text{Homospermidin}$ und HSS mit $[^{14}\text{C}]\text{Spermidin}$ im DHS-Assay. Während die DHS mit beiden Substraten Aktivität zeigt, ist die HSS im DHS-Assay inaktiv. Die Auswertung erfolgte nach 2.6.2.

3.11 Substratspezifität der DHS und HSS

Die Ergebnisse der Versuche in Kap. 3.10 mit DHS und HSS zeigten, dass beide Enzyme nicht nur Spermidin und Putrescin zu Homospermidin und 1,3-Diap umsetzen, sondern offensichtlich auch umgekehrt aus 1,3-Diap und Homospermidin wieder Spermidin und Putrescin herstellen können. Die Substratspezifität der beiden Enzyme war komplexer als erwartet. Um ein vollständiges Bild der Substratspezifitäten zu erhalten, wurde getestet, ob weitere Di- und Triamine der homologen Reihe als Substrat der DHS und HSS fungieren. Dabei dienten jeweils [^{14}C]Spermidin oder [^{14}C]Homospermidin als Aminobutyldonoren. DHS und HSS wurden mit je 400 μM der Di- und Triamine inkubiert und die Aminfraktionen nach Benzoylierung über Radio-HPLC analysiert (2.5.1). Die Inkubationszeiten wurden kürzer gewählt, als in den zuvor durchgeführten Versuchen, um Störungen durch Rezyklisierung der neugebildeten Amine möglichst gering zu halten. Die Tabelle 3.7 zeigt die Edukte und Produkte der Reaktionsansätze der HSS-Reaktion der HSS, Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse für die DHS.

Amino- butyl- donor	Amino- butyl- akzeptor	¹⁴ C-markierte Metaboliten (%)					
		Pyrr	C ₄	C ₄ C ₃	C ₄ C ₄	C ₄ C ₃ C ₄	C ₄ C ₄ C ₄ <u>Andere</u>
[¹⁴ C] C ₄ C ₃	-----	5,7	1,6	87,8	nd	4,9	
	C ₃	2,4	1,3	95,7	nd	0,6	
	C ₄	3,2	4,0	65,9	26,9	nd	
	C ₅	4,3	1,0	90	nd	0,7	C ₅ C ₄ 4,0
	C ₆	5,3	1,6	92,3	nd	0,8	
	C ₇	4,1	1,2	93	nd	1,7	
	C ₄ C ₄	5,4	1,0	91,2	nd	2,4	
	C ₃ C ₄ C ₃	8,3	1,6	87,5	nd	2,6	
C ₄ C ₃	[¹⁴ C] C ₄	nd	70,9	1,0	23,8	4,3	
[¹⁴ C] C ₄ C ₄	-----	0,6	0,9	nd	96,0		2,5
	C ₃	nd	20,0	14,5	62,4		3,1
	C ₄	nd	18,5	nd	80,1		1,4
	C ₅	nd	1,4	nd	94,7		1,9
	C ₆	0,6	1,1	nd	96,2		2,1
	C ₇	0,5	0,4	nd	96,8		2,2
	C ₃ C ₄	0,5	0,9	nd	96,2		2,4
	C ₃ C ₄ C ₃	0,5	1,2	nd	96,2		2,1
C ₄ C ₄	[¹⁴ C] C ₄	0,4	73,4	nd	26,2		nd

Tab. 3.7 ¹⁴C-Markierung in den Reaktionsprodukten der HSS-Reaktion der HSS

Äquimolare Mengen (je 400 µM) des ¹⁴C-markierten Substrats und des unmarkierten Substrats wurden mit je 2 pkat Enzym (bezogen auf den Standardinkubationsansatz mit je 400 µM Putrescin und Spermidin) in einem Gesamtvolumen von 50 µl über 60 min bei 30°C inkubiert. Nach der Derivatisierung mit Benzoylchlorid erfolgte die Trennung der Reaktionsprodukte mit der Radio-HPLC nach 2.5.1. Folgende ¹⁴C-markierte Substrate kamen zum Einsatz: [1,4-¹⁴C]Putrescin ([1,4-¹⁴C] Tetramethylen-1,4-diamin), [¹⁴C]Spermidin (N-(3-Aminopropyl)-[1,4-¹⁴C]tetramethylen-1,4-diamin, [¹⁴C]Homospermidin ([1,4,6,9-¹⁴C] 5-Aza-1,9-diaminononan). Die Identifizierung der langen Tetraamine erfolgte mit GC-MS nach 2.5.2. Abkürzungen: C₃: 1,3-Diaminopropan, C₄: 1,4-Diaminobutan (Putrescin), C₅: 1,5-Diaminopentan (Cadaverin), C₆: 1,6-Diaminohexan, C₇: 1,7-Diaminoheptan, C₃C₄: Spermidin, C₄C₄: Homospermidin, C₃C₄C₃: Spermin, C₅C₄: Aminobutylcadaverin, C₄C₃C₄: Canavalmin (5,9-Diaza-1,13-diaminotridecan), C₄C₄C₄: Homospermin(5,10-Diaza-1,14-diaminotetradecan), Pyrr: 1-Pyrrolin, nd: nicht detektiert

Amino- butyl- donor	Amino- butyl- akzeptor	¹⁴ C-markierte Metabolite (%)						
		Pyrr	C ₄	C ₄ C ₃	C ₄ C ₄	C ₄ C ₃ C ₄	C ₄ C ₄ C ₄	andere
[¹⁴ C] C ₄ C ₃	-----	1,5	1,1	74,7	nd	22,7		
	C ₃	1,2	1,3	87,3	nd	10,2		
	C ₄	1,9	2,1	65,7	14,5	15,8		
	C ₅	1,6	1,2	72	nd	19,7		C ₅ C ₄ 2,7
	C ₆	1,6	1,1	75,6	nd	21,8		
	C ₇	1,8	1,3	82,1	nd	14,8		
	C ₄ C ₄	1,8	1,3	80,1	nd	16,9		
	C ₃ C ₄ C ₃	1,4	1,5	79,9	nd	17,1		
C ₄ C ₃	[¹⁴ C] C ₄	nd	71,3	1,9	26,4	nd		
[¹⁴ C] C ₄ C ₄	-----	nd	0,9	nd	96,4		2,7	
	C ₃	nd	21,9	16,2	60,1		1,7	
	C ₄	1	10	nd	86,4		2,6	
	C ₅	0,5	1,7	nd	91		2	C ₅ C ₄ 4,9
	C ₆	0,5	1,1	nd	95,8		2,6	
	C ₇	nd	1,2	nd	96		2,8	
	C ₃ C ₄	nd	2,6	1,7	93,3		2,4	
	C ₃ C ₄ C ₃	nd	4,6	nd	93,3		2,1	
C ₄ C ₄	[¹⁴ C] C ₄	nd	73,6	nd	26,4		nd	

Tab. 3.8 ¹⁴C-Markierung in den Reaktionsprodukten der HSS-Reaktion mit DHS. Bedingungen wie bei den Versuchen mit der HSS (Tab. 3.7)

Folgende Ergebnisse wurden bei diesen Experimenten erzielt: Beide Enzyme verwenden neben Spermidin auch Homospermidin als Aminobutyl-donor (s. auch dazu Kap. 3.10): Wurde ¹⁴C-markiertes Putrescin mit unmarkiertem Homospermidin inkubiert, so tauchte im Verlauf der Inkubation auch [¹⁴C]Homospermidin auf, das nur durch die Übertragung eines Aminobutylrests aus Homospermidin auf [¹⁴C]Putrescin entstanden sein konnte. DHS und HSS übertrugen die Aminobutyleinheit aus Spermidin oder Homospermidin aber nicht nur auf Putrescin, sondern auch auf die beiden nächsten Homologen 1,3-Diaminopropan und 1,5-Diaminopentan (Cadaverin): Bei der Inkubation von [¹⁴C]Homospermidin mit 1,3-Diaminopropan entstand [¹⁴C]Spermidin und [¹⁴C]Put, da das [¹⁴C]Homospermidin mit zwei ¹⁴C-Markierungen an C-1 und C-4 in beiden Molekülhälften radioaktiv markiert war (s.

3.10). Analog dazu entstanden bei der Inkubation von [^{14}C]Homospermidin und Cadaverin [^{14}C]Putrescin und [^{14}C]Aminobutylcadaverin (Abb. 3.29, 3.30), jedoch in geringeren Mengen als bei der Inkubation mit dem natürlichen Aminobutylakzeptor Putrescin. Die Inkubation mit [^{14}C]Spermidin und Cadaverin lieferte [^{14}C]Aminobutylcadaverin (Abb. 3.29). Die nächstlängeren Diamine der homologen Reihe 1,6-Diaminohexan und 1,7-Diaminoheptan wurden von keinem der beiden Enzyme als Aminobutylakzeptor verwendet. Besonders bei der DHS-Inkubation mit [^{14}C]Spermidin entstanden große Mengen eines neuen Produktes X, das bis zu 22,7% der gefütterten radioaktiven Markierung enthielt und nach ca. 14 min von der HPLC-Säule eluierte (Peak d in Abb. 3.26). Dabei mußte es sich um ein aminobutyliertes Derivat des Spermidins handeln, denn dieses Produkt entstand auch bei der Inkubation der HSS mit [^{14}C]Spermidin ohne Zugabe eines Aminobutylakzeptors. Die DHS nutzte demnach mit und ohne im Inkubationsansatz vorhandenen passenden Aminobutylakzeptor auch den eigentlichen Donor der Aminobutyleinheit als Aminobutylakzeptor. Somit mußte ein „Aminobutyl-Spermidin“ (5,9-Diaza-1,13-diaminotridecan = Canavalmin $\text{C}_4\text{C}_3\text{C}_4$) bzw. ein „Aminopropyl-Homospermidin“ (4,9-Diaza-1,13-diaminotridecan, $\text{C}_3\text{C}_4\text{C}_4$) entstanden sein, je nachdem, ob der Aminobutylrest am Aminopropylende oder am Aminobutylende des Spermidins angeknüpft wurde. Zur Identifizierung der Struktur wurden GC/MS-Analysen durchgeführt (Kapitel 3.12). Die Inkubation mit [^{14}C]Homospermidin lieferte ein markiertes Produkt, welches nach ca. 16 min von der HPLC-Säule eluierte (Abb. 3.28). Vermutlich handelte es sich dabei um ein „Aminobutyl-Homospermidin“ (5,10-Diaza-1,14-diaminotetradecan, $\text{C}_4\text{C}_4\text{C}_4$), das ebenfalls noch per GC/MS eindeutig identifiziert werden mußte. Die Mengen an Radioaktivität in diesem Produkt waren nicht so hoch (1,6-3%), wie bei den Inkubationsansätzen der DHS mit [^{14}C]Spermidin. Die entsprechenden Peaks bei der Inkubation der HSS mit [^{14}C]Spermidin bzw. [^{14}C]Homospermidin machten nur 0,8-4,9% der gesamten Radioaktivität aus. Spermidin konkurriert offensichtlich mit Putrescin im HSS-Assay um die Aminobutylakzeptor-Bindungsstelle des Enzyms. Das ist bei der HSS anders, hier verdrängt Spermidin das Putrescin nicht von seiner Bindungsstelle, so daß überwiegend Homospermidin und nicht Aminobutylspermidin als Reaktionsprodukt entsteht.

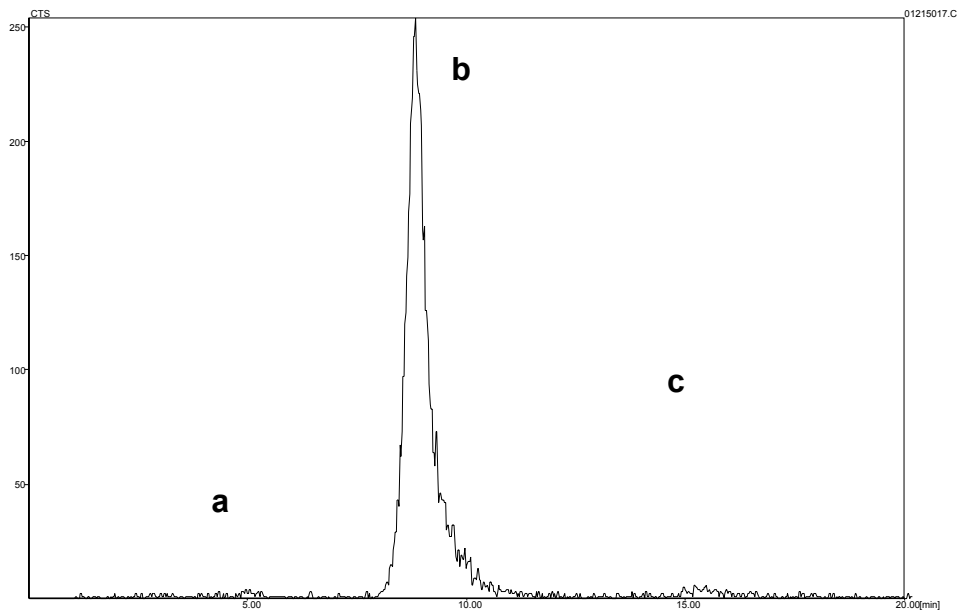


Abb. 3.28 HPLC-Chromatogramm (^{14}C -Kanal) der Amine eines Inkubationsansatzes mit HSS und $400\ \mu\text{M}$ [^{14}C]Homospermidin. Peak a: Putrescin, 5,1 min, Peak b: Homospermidin, 9,2 min, Peak c: unbekanntes Produkt, 16,0 min. Auch bei der Inkubation mit DHS tauchte Peak c auf (s. Tab. 3.7)

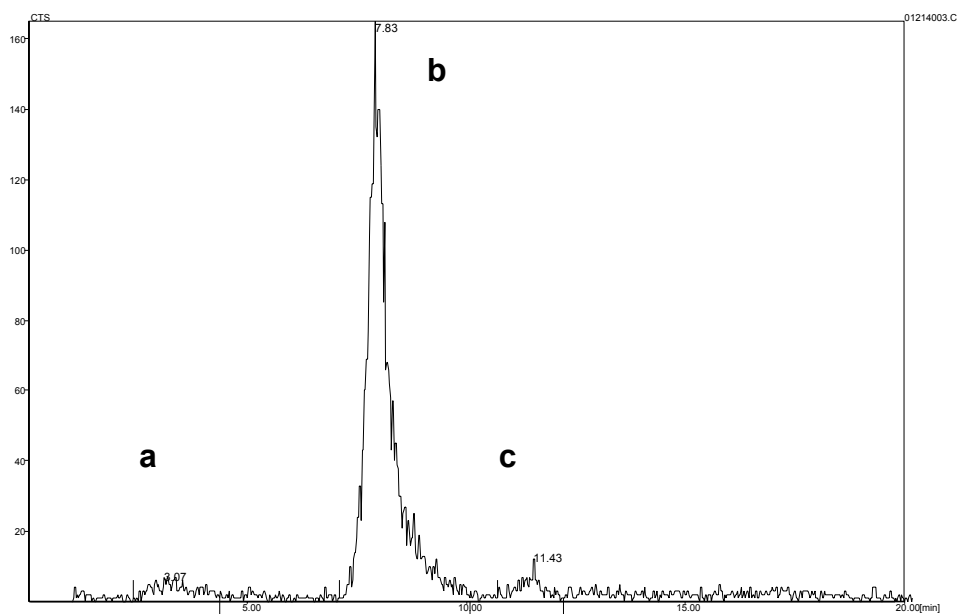


Abb. 3.29 HPLC-Chromatogramm (^{14}C -Kanal) der nach 2.5.1 derivatisierten Polyamine eines Inkubationsansatzes mit HSS und je $400\ \mu\text{M}$ [^{14}C]Spermidin und Cadaverin. 1-Pyrrolin, 3,1 min (a); Spermidin, 7,8 min (b); Aminobutylcadaverin, 11,4 min (c).

3.12 Identifizierung der Reaktionsprodukte durch GC/MS

Die in Verbindung mit der Bestimmung der Substratspezifität der HSS und DHS ermittelten Reaktionsprodukte mussten in ihrer chemischen Identität gesichert werden. Dies erfolgte durch GC-MS. Insgesamt mussten folgende 3 angenommenen Reaktionsprodukte eindeutig identifiziert werden:

- Aminobutylcadaverin (C_4C_5) das Aminobutylierungsprodukt von Cadaverin.
- Aminobutylspermidin, das Aminobutylierungsprodukt von Spermidin. Da hier zwei isomere Produkte denkbar sind ($C_4C_3C_4$ und $C_4C_4C_3$), musste geklärt werden, welches der beiden entsteht.
- Aminobutylhomospermidin ($C_4C_4C_4$), das Aminobutylierungsprodukt von Homospermidin.

Die Identifizierung aller unbekannten Amine erfolgte in Form ihrer Methoxycarbamate (MOC-Derivate), d.h. nach Derivatisierung der Amine mit Chlorameisensäuremethylester (2.5.2). Die Retentionsindices (RI-Werte) und Molekulargewichte (M^+) aller untersuchten und als Standards eingesetzten derivatisierten Amine sind aus Tab. 3.9 zu entnehmen.

Di-/Polyamin		RI	Molekülion M^+
1,3-Diaminopropan	(C_3)	1485	190
1,4-Diaminobutan (Put)	(C_4)	1622	204
1,5-Diaminopentan (Cad)	(C_5)	1727	218
N-[3-Aminopropyl]-1,4-diaminobutan (Spermidin)	(C_4C_3)	2365	319
N-[4Aminobutyl]-1,4-diaminobutan (Homospermidin)	(C_4C_4)	2467	333
N-[4Aminobutyl]-1,5-diaminopentan (Aminobutylcadaverin)	(C_4C_5)	2570	347
Norspermin	($C_3C_3C_3$)	2953	420
Spermin	($C_3C_4C_3$)	3055	434
Canavalmin	($C_4C_3C_4$)	3162	448
Homospermin	($C_4C_4C_4$)	3268	462

Tab.3.9 Retentionsindices (RI) und Molekülionen der mit GC-MS analysierten Di- und Polyamine nach Derivatisierung mit Chlorameisensäuremethylester nach 2.5.2

Die zu identifizierenden Reaktionsprodukte wurden in Großansätzen (1 ml) unter Einsatz nichtmarkierter Substrate unter den üblichen Reaktionsbedingungen (120 min, 30°C) hergestellt. Anschließend wurde das Protein mit 100 µl 10 N-HCl gefällt, abzentrifugiert und die Aminfraktion im Überstand unter dem Luftstrom zur Trockne eingengt, in 200 µl 0,1 N-HCl aufgenommen und über Dowex 50 W Kationenaustauscher gereinigt (2.5.4). Das Eluat wurde abermals unter dem Luftstrom zur Trockne eingengt und für die GC-MS-Analyse mit Chlorameisensäuremethylester nach 2.5.2 derivatisiert.

Identifizierung von Aminobutylcadaverin:

Aminobutylcadaverin wurde als MOC-Derivat aufgrund seines RI-Werts und M^+ identifiziert (Tab. 3.9, Abb. 3.30). Das Massenspektrum in Abb. 3.30 läßt neben der charakteristischen Molmasse des Moleküls $[M^+]$ m/z 347 weitere charakteristische Fragmente erkennen: Die Fragmente 185 und 199 entstanden aus 217 bzw. 231 durch Abspaltung von Methanol, 88, 217 und 231 entstanden durch α -Spaltung der Polyaminkette.

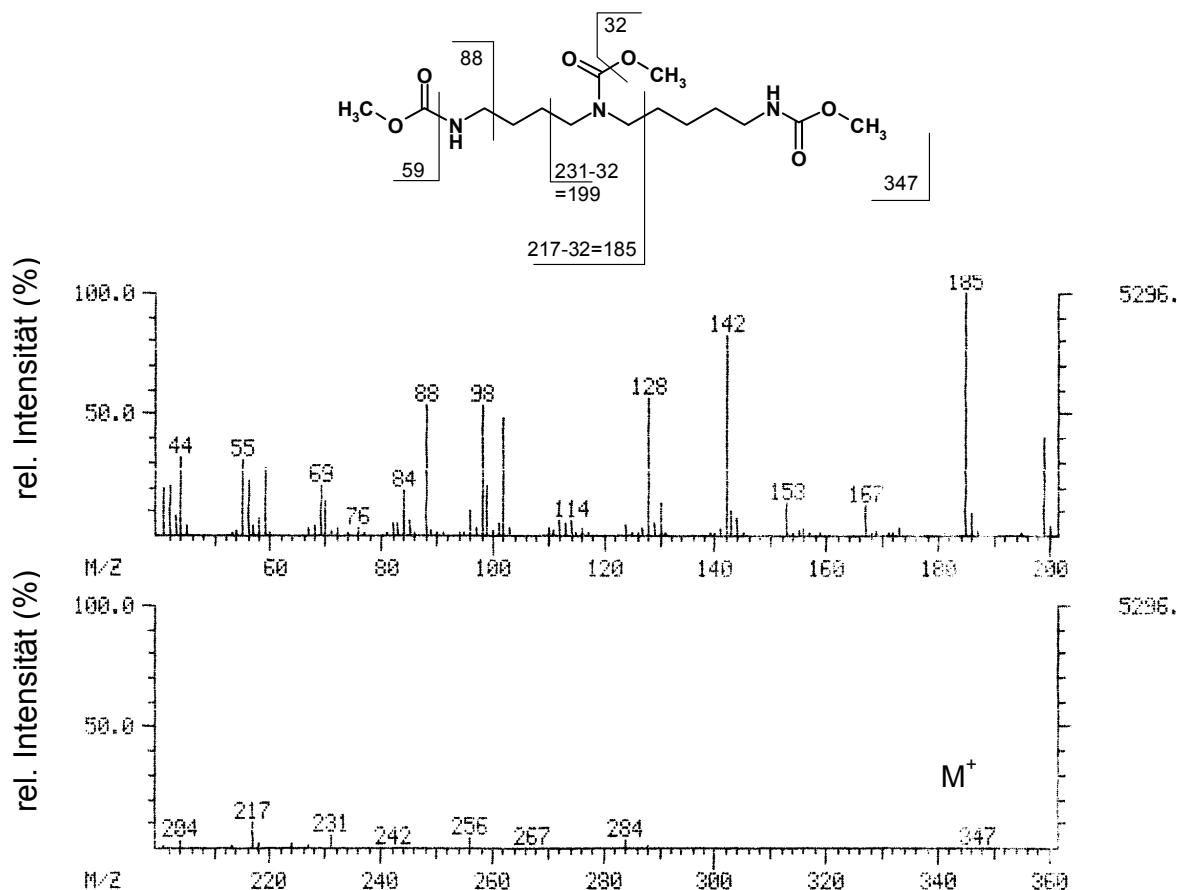


Abb. 3.30 Strukturformel und Massenspektrum mit charakteristischen Fragmenten des MOC-Derivats des Aminobutylcadaverins, isoliert aus einem Inkubationsansatz mit HSS, 400 μ M Spd und 400 μ M Cad. Die Derivatisierung erfolgte nach 2.5.2. Die Fragmente 185 und 199 entstanden aus 217 bzw. 231 durch Abspaltung von Methanol, 88, 217 und 231 entstanden durch α -Spaltung der Polyaminkette.

Die Identifizierung der Aminobutylierungsderivate von Spermidin (Canavalmin) und Homospermidin (Homospermin) erfolgte aus Ansätzen deren Zusammensetzung in Tab. 3.10 wiedergegeben ist. Die Aufarbeitung und Derivatisierung erfolgte so wie für den Ansatz mit Aminobutylcadaverin beschrieben. Um eine möglichst hohe Ausbeute der gewünschten Produkte zu erzielen, wurden die Inkubationen ohne weiteren Aminobutylakzeptor durchgeführt, d.h. Spermidin bzw. Homospermidin dienten gleichzeitig als Aminobutyldonor und -akzeptor.

a	b	c	d
400 μ M Spd	400 μ M Hspd	400 μ M Spd	400 μ M Hspd
500 μ M NAD ⁺	500 μ M NAD ⁺	500 μ M NAD ⁺	500 μ M NAD ⁺
70 pkat DHS	70 pkat DHS	70 pkat HSS	70 pkat HSS
1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Tab. 3.10 Zusammensetzung der DHS-/HSS-Inkubationsansätze zur Identifizierung der Aminobutylierungsprodukte.

Identifizierung von Aminobutylspermidin (Canavalmin):

Aminobutylspermidin (Canavalmin) konnte als MOC-Derivat aufgrund seines RI-Werts von 3164 und seines Molekülions $[M^+]$ m/z 448 identifiziert werden. Zudem wiesen nach 2.5.5 synthetisch hergestelltes Canavalmin und aus den Inkubationsansätzen a und c isoliertes Canavalmin nach Derivatisierung mit Chlorameisensäuremethylester vergleichbare Retentionsindices (3164 bzw. 3162) und Spektren auf. Die in beiden Massenspektren auftretenden Ionen 185 und 300 entstanden durch Abspaltung von Methanol aus den durch α -Spaltung entstandenen Ionen 217 bzw. 332 (Abb. 3.31 bzw. 3.32).

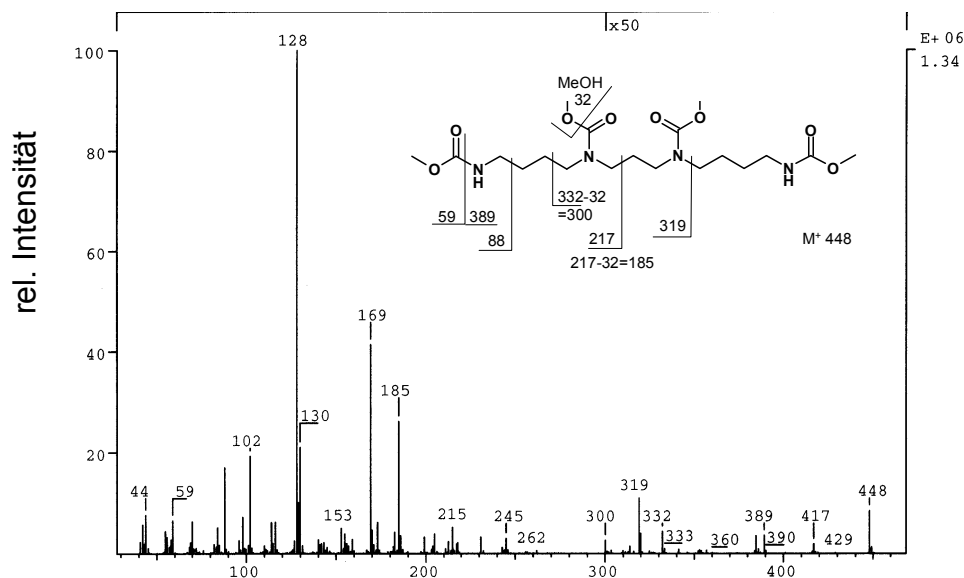


Abb. 3.31 Massenspektrum des MOC-Derivats des Reaktionsprodukts aus der Inkubation von Spermidin mit DHS (Ansatz a aus Tab. 3.10) mit Strukturformel und charakteristischen Fragmenten. In Ansatz c konnte ebenfalls dieses Produkt nachgewiesen werden.

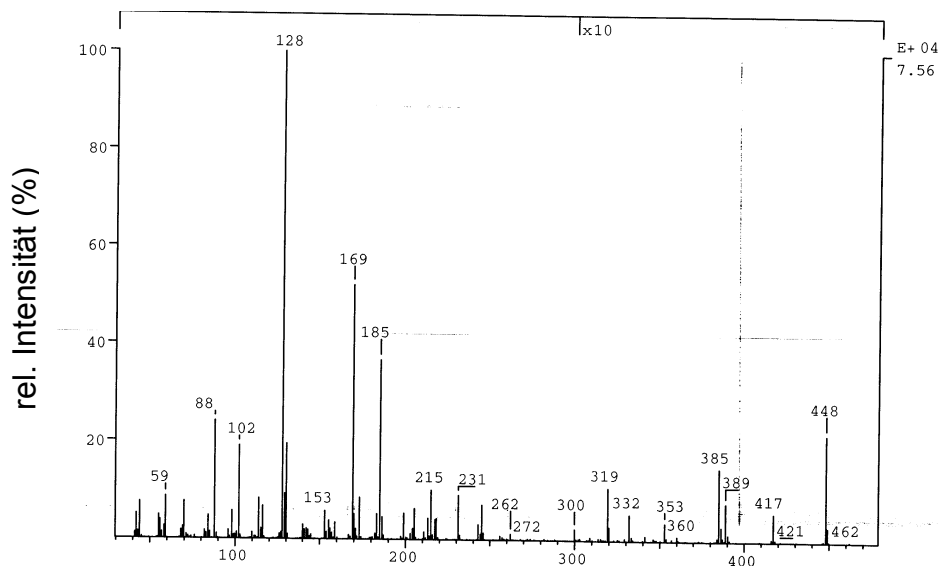


Abb. 3.32 Massenspektrum des MOC-Derivats des synthetischen Canavalmins (1,5-Diaza-1,13-diaminotridecan) Sowohl Massenspektren mit charakteristischen Fragmenten als auch Retentionsindices im Gaschromatogramm des aus den Ansätzen a und c isolierten Canavalmins und des synthetischen Canavalmins stimmten miteinander überein.

Identifizierung von Aminobutylhomospermidin (Homospermin):

Homospermin wurde als MOC-Derivat aufgrund seines RI-Werts und seines charakteristischen Massenspektrums in den Aminobutylierungsansätzen b und d identifiziert. Das Molekülion $[M^+]$ m/z hat mit 462 eine um 14 Masseneinheiten höhere Masse als dasjenige des Canavalmins (448). Dies entspricht der Masse einer Methylengruppe. Ebenso wie beim Canavalmin entstand auch beim Homospermin das Fragment 185 durch Methanolabspaltung aus Fragment 217. Statt Fragment 300 entstand hier jedoch das nächsthöhere Homologe 314 aus 346 durch Methanolabspaltung (Abb. 3.33).

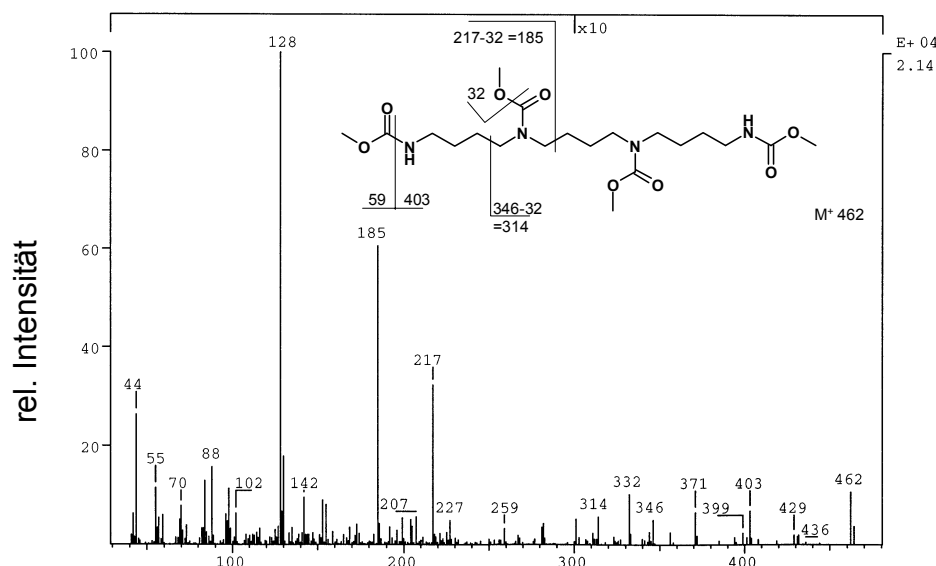


Abb. 3.33 Massenspektrum und Strukturformel des nach 2.5.2 mit Chlorameisensäuremethylester derivatisierten Homospermins (5,10-Diaza-1,14-diaminotetradecan), des Reaktionsprodukts aus Ansatz b. In Ansatz d konnte ebenfalls Homospermin detektiert werden.

Zur Identifizierung der in der GC-MS-Analyse des Tetraamins Canavalmin ($C_4C_3C_4$) entstandenen Fragmente wurde die hochauflösende Massenspektrometrie (2.5.2) angewendet. Nachdem durch Vergleich der Massenspektren geklärt worden war, daß es sich bei dem Produkt in der Reaktion der HSS und DHS mit Spermidin um das Canavalmin ($C_4C_3C_4$ = Aminobutylspermidin) handelte (Synthese des Canavalmins s. 2.5.5), sollte die Herkunft des Fragments 169 geklärt werden. Wenn das Fragment aus dem Mittelteil des Moleküls stammte, so sollte neben dem Canavalmin ($C_4C_3C_4$) auch das niedrigere Homologe, das Norspermin (4,8-Diaza-

1,11-diaminoundecan = $C_3C_3C_3$), das ebenfalls eine Trimethyldiaminostruktur im Mittelteil aufwies, ein identisches Fragment ergeben. Auch das Norspermin war analog zur Synthese des Canavalmins synthetisch leicht zugänglich (2.5.5). Bei der Analyse mit GC-MS konnte hier jedoch statt des erwarteten Fragments 169 nur ein Fragment mit der Masse 155 detektiert werden, was bedeutete, daß nicht der mittlere Molekülteil sondern der äußere Teil maßgeblich an der Bildung dieses Fragments beteiligt war, an dem das Norspermin eine derivatisierte Aminopropylgruppe besaß, während das Canavalmin mit einer derivatisierten Aminobutylgruppe ausgestattet war und daher ein um 14 Masseneinheiten schwereres Fragment lieferte. Hochauflösungsmessungen der charakteristischen Fragmente 155 des Norspermins und 169 des Canavalmins wurden durchgeführt und ergaben das auf Millimasseneinheiten genau berechnete Molekulargewicht des jeweiligen Fragments (Tab. 3.11). Die Präzisionsmasse des Fragments 155 aus dem Norspermin wurde mit 155,100 genau ermittelt, die Präzisionsmasse des Canavalmin-Fragments 169 betrug genau 169,112. Der Vergleich dieser Daten mit in der Literatur angegebenen möglichen Fragmenten derselben Masse lieferten für 155,100 ein Fragment der Masse 155,095 mit der Summenformel $C_8H_{13}NO_2$, für Fragment 169 ein Fragment mit der Masse 169,110 mit der Summenformel $C_9H_{15}NO_2$. Somit kamen nur die in den Strukturformeln der Abbildungen 3.34 bzw. 3.35 eingezeichneten Fragmente in Frage.

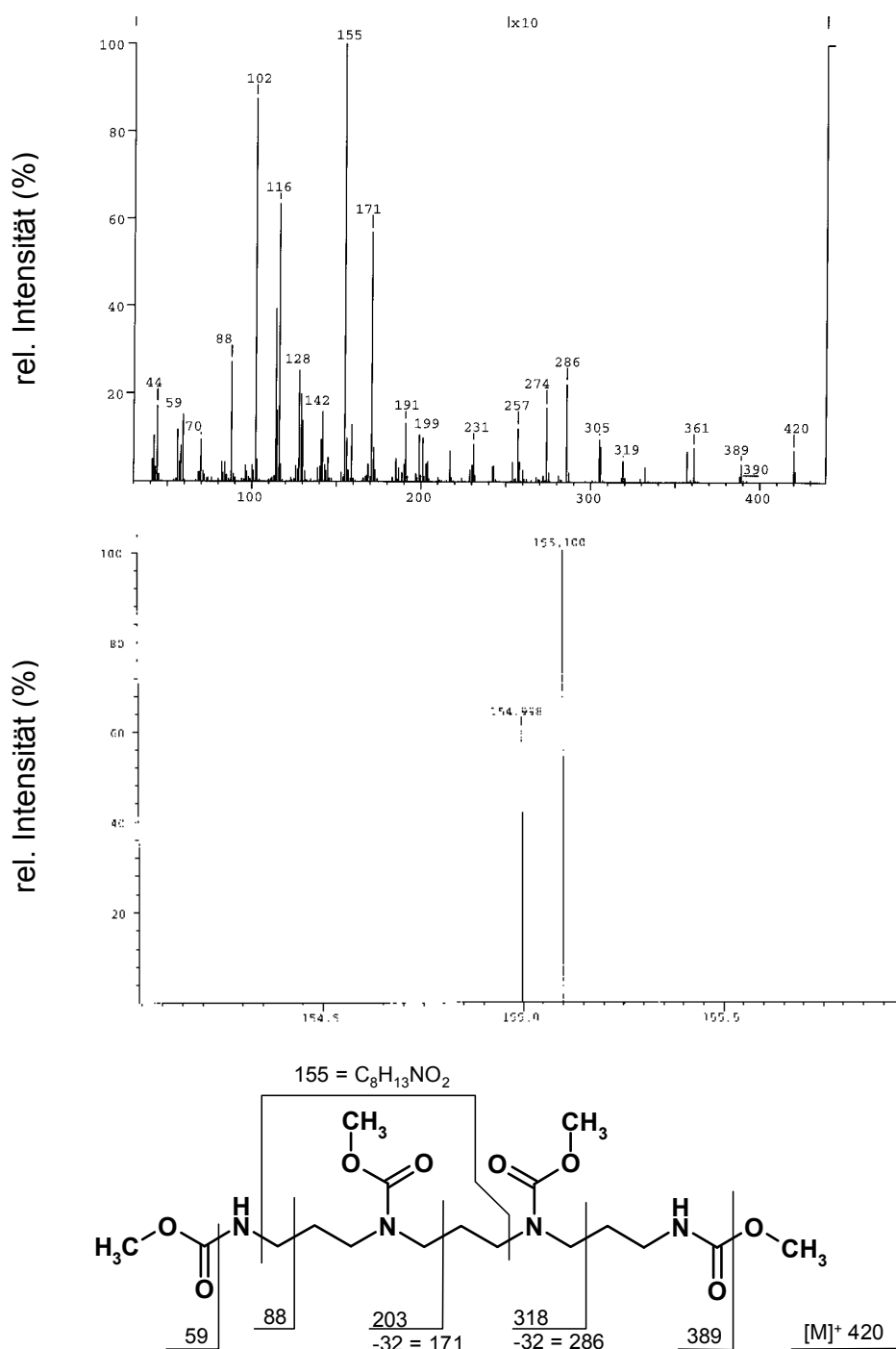


Abb. 3.34 Massenspektrum des nach 2.5.2 derivatisierten synthetischen Norspermins (4,8-Diaza-1,11-diaminoundecan; Synthese nach 2.5.5) (oben), Hochauflösungsmessung des charakteristischen Fragments 155 mit gemessener Präzisionsmasse 155,100 (Mitte) und Strukturformel mit charakteristischen Fragmenten (unten).

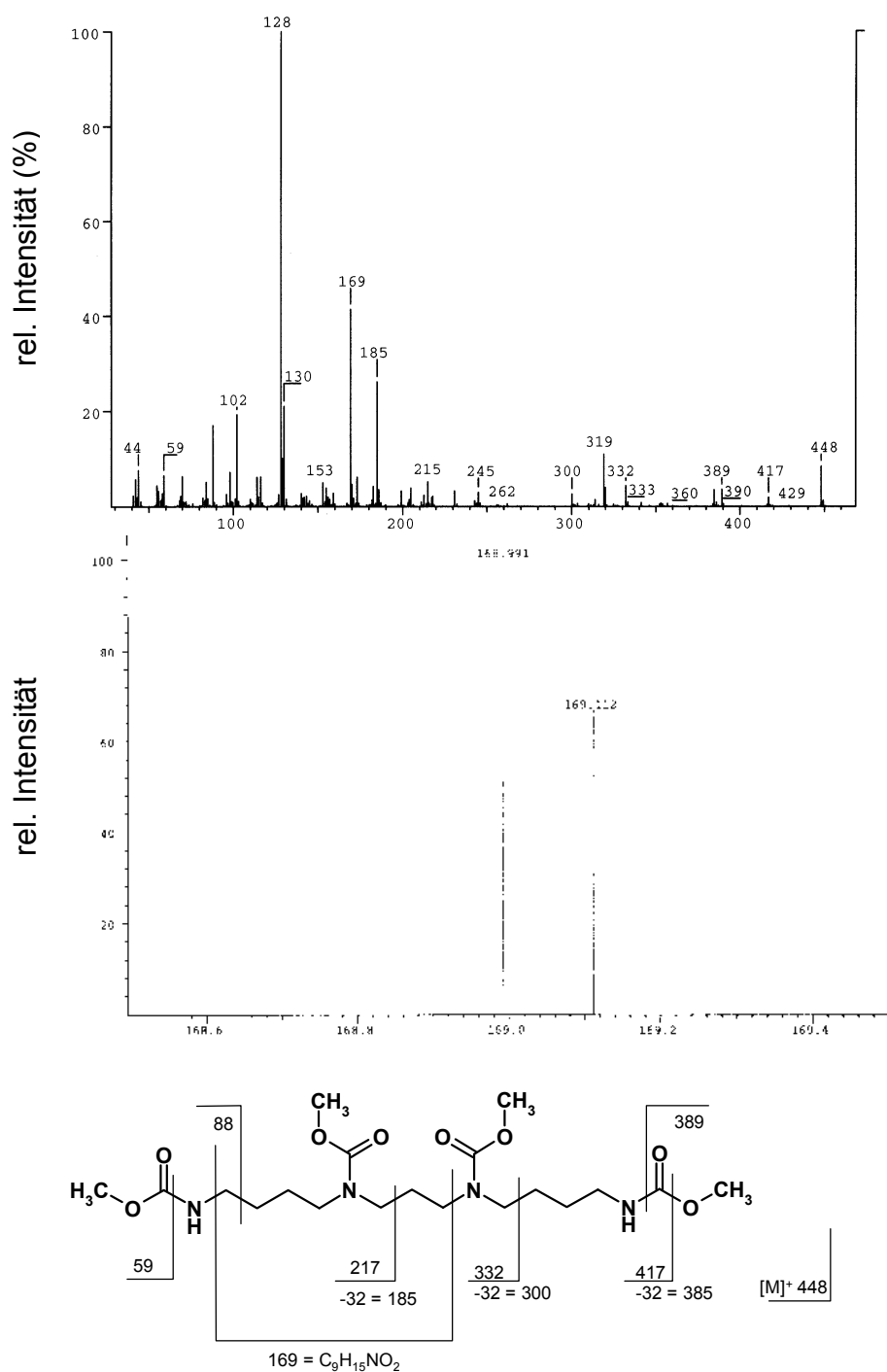


Abb. 3.35 Massenspektrum des mit Chlorameisensäuremethylester derivatisierten Canavalmins (Derivatisierung nach 2.5.2) aus dem Inkubationsansatz von HSS und DHS mit Spermidin (oben), Hochauflösungsmessung des charakteristischen Fragments 169 mit gemessener Präzisionsmasse 169,112 (Mitte) und Strukturformel des Derivats mit charakteristischen Fragmenten (unten).

Molekül	Fragment	gemessene Präzisionsmasse	berechnete Präzisionsmasse	Summenformel
Norspermin (synth.) (C ₃ C ₃ C ₃) [M] ⁺ = 420	155	155,100	155,095	C ₈ H ₁₃ NO ₂
Canavalmin (C ₄ C ₃ C ₄) [M] ⁺ = 448	169	169,112	169,110	C ₉ H ₁₅ NO ₂

Tab. 3.11 Fragmente 155 und 169 aus den MOC-Derivaten des Norspermins (C₃C₃C₃) und des Canavalmins (C₄C₃C₄) mit gemessenen und berechneten Präzisionsmassen und dafür tabellarisch bestimmten Summenformeln.

3.13 Substratkinetiken von DHS und HSS

Um die Affinität der Enzyme zu ihren Substraten in der HSS-Reaktion zu ermitteln, wurden die apparenten K_M -Werte von Putrescin und Spermidin für DHS und HSS bestimmt. Da Homospermidin nicht nur Produkt der HSS-Reaktion ist, sondern auch Spermidin als Substrat ersetzen kann, wurden auch für Homospermidin als Aminobutyldonor die apparenten K_M -Werte ermittelt. Neben den Ansätzen mit 40 μ M Putrescin oder Spermidin als konstantem zweiten Substrat, wurden auch Ansätze mit unphysiologisch hohen Konzentrationen von 400 μ M und 1000 μ M untersucht, um einen möglichen kompetitiven Einfluß auf den K_M -Wert für das jeweilige erste Substrat zu überprüfen. Gerade bei den Versuchen zur Substratspezifität der DHS hatte sich gezeigt, dass Spermidin Putrescin als Aminobutylakzeptor verdrängen kann, so dass in erheblichem Ausmaß neben Homospermidin auch Canavalmin gebildet wird (Kap. 3.11). Ob diese erhöhte Affinität der DHS zum Spermidin durch Erhöhung der Put-Konzentration veränderbar war, d. h., ob kompetitive Effekte eine Rolle spielten, sollte überprüft werden. Alle Bestimmungen erfolgten im Standardinkubationsansatz für die Bestimmung von HSS-Aktivität nach 2.6.1 mit 0,5 – 2,5 pkat Enzym/Ansatz, die Inkubationen erfolgten über 0 – 60 min in 50 μ l-Gesamtansätzen bei 30°C. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt (Ansätze a und b), wobei der Durchschnittswert aus den K_M -Wert-Bestimmungen nach Hanes und Lineweaver-Burk ermittelt wurde. Dieses Verfahren wurde deswegen

angewendet, da in der Darstellung nach Lineweaver-Burk die Ansätze mit geringen Substratkonzentrationen überbewertet werden. Hier macht sich die Abnahme eines Substrats im Verlauf der Reaktion stärker bemerkbar als in den Ansätzen mit höheren Substratkonzentrationen bzw. Substratsättigung. Messfehler sind deshalb in den niedrig konzentrierten Ansätzen größer. Es besteht bei niedrigen Substratkonzentrationen die Gefahr, dass die Ansätze wegen der starken Substratabnahme über die Messzeit nicht linear bleiben. Tab. 3.12 zeigt die Werte für die DHS, Tab. 3.13 die Werte für die HSS.

DHS:

Substrat	2. Substrat	a		b		(a+b)/2	s	s rel.
Put	40µM Spd	L.-B.	239,9	L.-B.	220,8			
		Hanes	160,5	Hanes	167,2			
		d	200,2	d	194	197,1	3,1	1,57%
Put	400µM Spd	L.-B.	1797	L.-B.	1589,5			
		Hanes	1711	Hanes	1612,5			
		d	1754	d	1606	1680	74	4,40%
Put	1000µM Spd	L.-B.	1198	L.-B.	1395,7			
		Hanes	1151	Hanes	1360,3			
		d	1174,5	d	1378	1276	102	8,00%
Substrat	2. Substrat	a)		b)		(a+b)/2	s	s rel.
Spd	40µM Put	L.-B.	4,25	L.-B.	3,81			
		Hanes	4,54	Hanes	5,06			
		d	4,40	d	4,44	4,42	0,02	0,5%
Spd	400µM Put	L.-B.	22,44	L.-B.	25			
		Hanes	27,75	Hanes	31,13			
		d	25,1	d	28,07	26,59	1,49	5,59%
Spd	1000µM Put	L.-B.	142,5	L.-B.	158			
		Hanes	136	Hanes	86			
		d	139,25	d	122	130,63	8,63	6,60%
Substrat	2. Substrat	a)		b)		(a+b)/2	s	s rel.
Hspd	40µM Put	L.-B.	8,54	L.-B.	4,14			
		Hanes	9,32	Hanes	4,12			
		d	8,93	D	4,13	6,53	2,4	36,75%
Hspd	400µM Put	L.-B.	34,8	L.-B.	31,5			
		Hanes	31,2	Hanes	26,5			
		d	33,0	d	29,0	31,0	2,0	6,45%
Hspd	1000µM Put	L.-B.	52,57	L.-B.	49,86			
		Hanes	79,4	Hanes	34,89			
		d	65,99	d	42,38	54,19	11,8	21,79%

Tab. 3.12 K_M -Werte der DHS für Put, Spermidin und Homospermidin bei verschiedenen Konzentrationen des zweiten Substrats. Die Auswertung des HSS-Assays erfolgte mit der Radio-DC-Software der Fa. Raytest nach 2.6.1.

HSS:

Substrat	2. Substrat	a		b		(a+b)/2	s (μM)	s rel.
Put	40μM Spd	L.-B.	106,7	L.-B.	129,2			
		Hanes	144,9	Hanes	167,4			
		d	125,8	d	148,3	137,1	11,24	8,20%
Put	400μM Spd	L.-B.	139,3	L.-B.	152,9			
		Hanes	222,2	Hanes	189,9			
		d	180,8	d	171,4	176,1	4,7	2,67%
Put	1000μM Spd	L.-B.	159,1	L.-B.	178,3			
		Hanes	218,7	Hanes	227,83			
		d	188,65	d	203,6	195,9	7,71	3,68%
Substrat	2. Substrat	a)		b)		(a+b)/2	s(μM)	s rel.
Spd	40μM Put	L.-B.	90,5	L.-B.	82,6			
		Hanes	128,54	Hanes	97,2			
		d	109,52	d	89,9	99,7	9,8	9,8%
Spd	400μM Put	L.-B.	68,1	L.-B.	59,2			
		Hanes	66,9	Hanes	66,6			
		d	67,5	d	62,9	65,2	2,3	3,53%
Spd	1000μM Put	L.-B.	63,7	L.-B.	58,3			
		Hanes	60,8	Hanes	41,1			
		d	62,3	d	49,7	56	6,3	11,20%
Substrat	2. Substrat	a)		b)		(a+b)/2	s (μM)	s rel.
Hspd	40μM Put	L.-B.	7,99	L.-B.	9,12			
		Hanes	7,43	Hanes	4,13			
		d	7,71	d	6,58	7,15	0,565	7,90%
Hspd	400μM Put	L.-B.	29,3	L.-B.	26,3			
		Hanes	31,6	Hanes	31,9			
		d	30,5	d	29,1	29,8	0,7	2,35%
Hspd	1000μM Put	L.-B.	124,5	L.-B.	160,2			
		Hanes	126,6	Hanes	52,5			
		d	125,58	d	106,34	115,96	9,6	8,3%

Tab. 3.13 K_M-Werte für die HSS. Die Bedingungen sind dieselben wie bei der DHS.

Folgende Ergebnisse wurden bei den K_M -Wert-Bestimmungen erzielt: Der apparente K_M -Wert für Putrescin liegt bei DHS und HSS in der HSS-Reaktion bei Anwesenheit von 40 μM Spermidin bei 197,1 bzw. 137,1 μM , also in derselben Größenordnung. Bei Erhöhung der konstanten Konzentration des 2. Substrats Spermidin auf 400 bzw. 1000 μM steigt der apparente K_M -Wert der DHS für Putrescin stark auf 1680 bzw. 1276 μM an, während die Erhöhung der Spermidin-Konzentration bei der HSS auf 400 bzw. 1000 μM den apparenten K_M -Wert für Putrescin nur unwesentlich auf 176,1 bzw. 195,9 μM erhöht (Abb. 3.36). Besonders bei der DHS scheint Spermidin mit Putrescin um dessen Bindung an das aktive Zentrum zu konkurrieren. Spermidin scheint Putrescin nicht nur kompetitiv zu verdrängen, sondern wird als Aminobutylakzeptor anstelle von Putrescin verwendet. Die im Vergleich zur HSS relativ hohen Mengen an gebildetem Canavalmin bestätigen dies (s. Tab. 3.8).

Der apparente K_M -Wert für Spermidin mit 40 μM Putrescin im Reaktionsansatz lag für die DHS bei 4,4 μM und stieg bei Erhöhung der Put-Konzentration auf 400 μM bzw. 1000 μM auf 26,6 μM bzw. 52,1 μM , für die HSS lag er bei 99,7 μM , 65,2 μM bzw. 56 μM . Während bei der DHS eine Erhöhung der Put-Konzentration den K_M -Wert für Spermidin erhöht, bleibt der K_M -Wert für Spermidin bei Erhöhung der Put-Konzentration im Ansatz mit HSS in derselben Größenordnung.

Die apparenten K_M -Werte für Homospermidin mit 40, 400 bzw. 1000 μM Putrescin im Ansatz lagen für die DHS bei 6,5, 31,0 bzw. 54,2 μM , für die HSS lagen sie bei 7,2, 29,8 bzw. 116,0 μM .

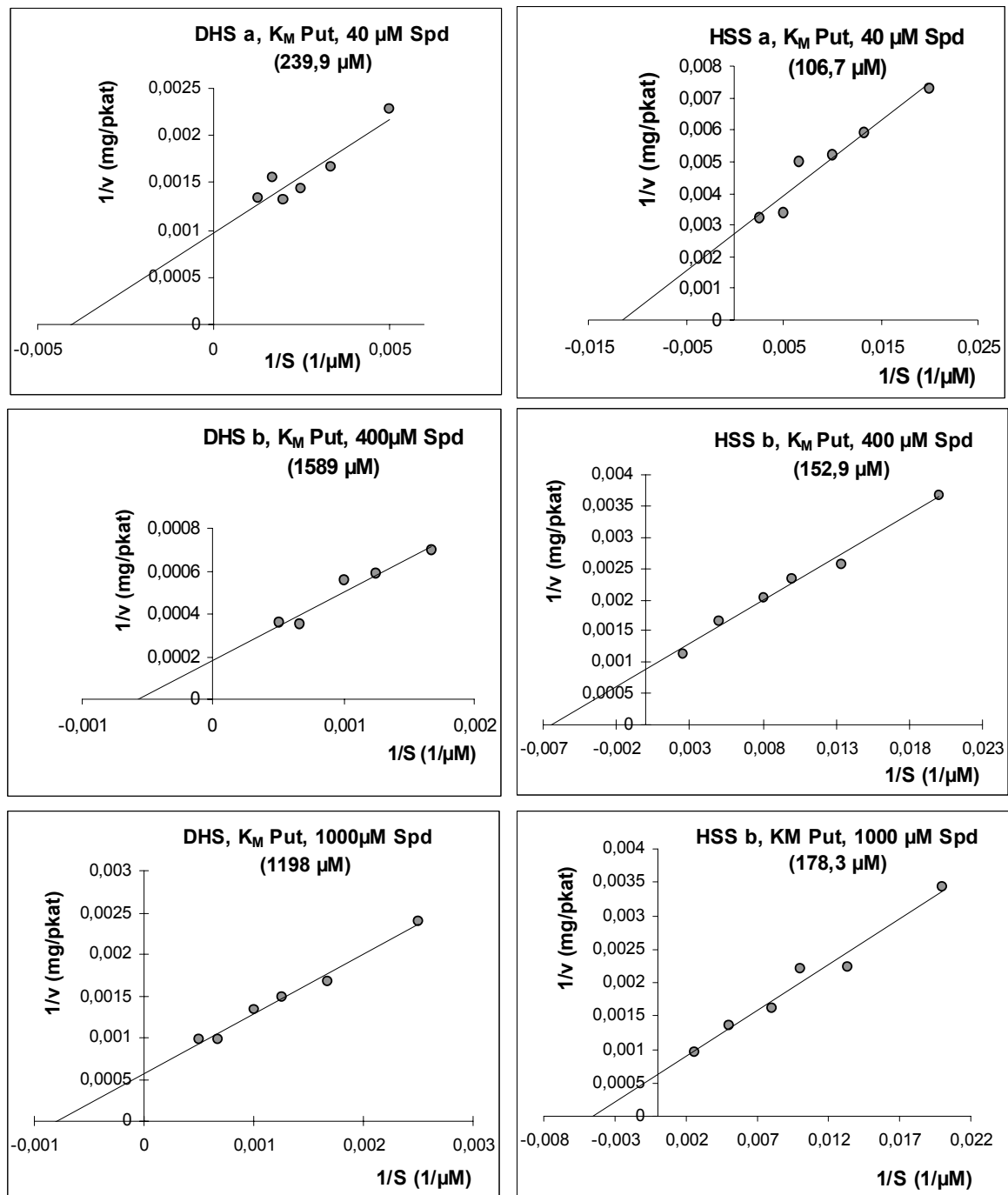


Abb. 3.36 Bestimmung der apparenten K_M -Werte für Putrescin von DHS und HSS in Gegenwart von 40, 400 und 1000 μ M Spermidin als 2. Substrat, Auswertung im Lineweaver-Burk-Diagramm. Die hier dargestellten Diagramme repräsentieren jeweils eine von zwei K_M -Wert-Bestimmungen, die jeweils vergleichbare Ergebnisse lieferten. Die Mittelwerte der Doppelbestimmungen sind in Tab. 3.12 bzw. 3.13 wiedergegeben. Während sich der K_M -Wert bei der DHS für Putrescin mit steigender Spermidin-Konzentration stark erhöht (239,9, 1589 bzw. 1198 μ M), ändert er sich bei der HSS nur geringfügig (106,7, 152,9 bzw. 178,3 μ M).

Nachdem die apparenten K_M -Werte für Put, Spermidin und Homospermidin in der HSS-Reaktion bestimmt worden waren, sollten auch die K_M -Werte für eIF5A und Spermidin in der DHS-Reaktion für die DHS ermittelt werden. In Anwesenheit von 10 μM Spermidin ergab sich ein apparenter K_M -Wert für eIF5A von 2,2 μM (Abb. 3.37), für Spermidin in Anwesenheit von 10 μM eIF5A lag der K_M -Wert bei 7,0 μM (Abb. 3.38). (Angabe ist jeweils der Mittelwert aus Lineweaver-Burk- und Hanes-Plot).

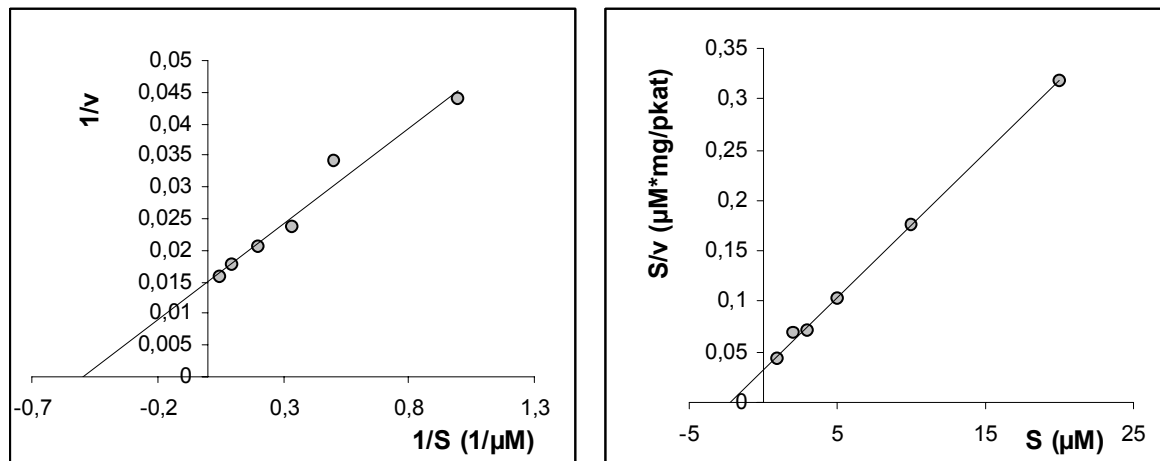


Abb. 3.37 Bestimmung der apparenten K_M -Werte für eIF5A in Gegenwart von 10 μM Spermidin für die DHS im DHS-Assay. In der Auftragung der Daten nach Lineweaver und Burk (links) wurde ein K_M -Wert von 2,0 μM ermittelt, in der Auftragung nach Hanes (rechts) ergab sich ein K_M -Wert von 2,3 μM für eIF5A.

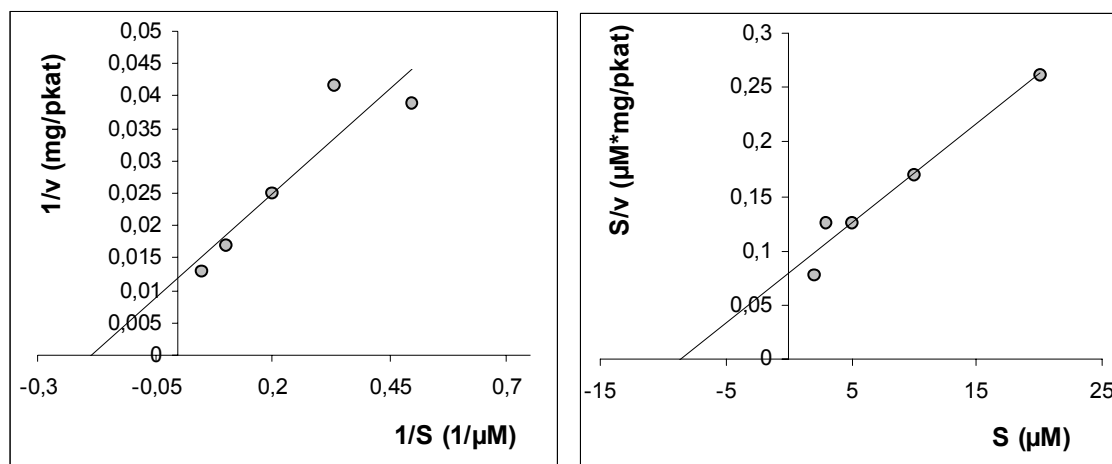


Abb. 3.38 Bestimmung der apparenten K_M -Werte für Spermidin für die DHS-Reaktion der DHS in Anwesenheit von 10 μM eIF5A. In der Auftragung der ermittelten Werte nach Lineweaver und Burk ergab sich ein K_M -Wert für Spermidin von 5,4 μM (links), in der Auftragung nach Hanes (rechts) ein K_M -Wert von 8,5 μM .

3.14 Substrat-Kompetitionsversuche

Nachdem die K_M -Werte von Putrescin, Spermidin, und Homospermidin für beide Enzyme in der HSS-Reaktion sowie für Spermidin und eIF5A in der DHS-Reaktion bestimmt worden waren, sollte der gegenseitige Einfluß der Substrate auf die DHS- und HSS-Aktivität ermittelt werden. Aus der Literatur war bekannt, dass HSS und DHS beispielsweise durch 1,3-Diaminopropan gehemmt werden. 1,3-Diaminopropan entsteht nicht nur als Nebenprodukt bei der spermidinabhängigen Aminobutylierung, sondern ist, wie wir zeigen konnten, auch Substrat als Aminobutylakzeptor (s. Abb. 3.23 und Tab. 3.7 u. 3.8). Es wurden Substratkinetiken mit den Substraten Putrescin, Spermidin und eIF5A durchgeführt, in Gegenwart fester Konzentrationen der Substrate 1,3-Diaminopropan, Putrescin und eIF5A. HSS- und DHS-Assays wurden wie unter 2.6.1 bzw. 2.6.2 beschrieben durchgeführt. Zur Ermittlung von K_M und v_{max} wurde die doppelt reziproke Darstellung nach LINEWEAVER und BURK gewählt. Anhand dieser Darstellung war es möglich, die Veränderung von K_M bzw. v_{max} zu ermitteln, die durch die Erhöhung der Inhibitorkonzentration eintrat, und den Typ der Hemmung durch den jeweiligen Inhibitor zu erkennen.

Beeinflussung der Substratkinetik von Putrescin durch 1,3-Diaminopropan bei HSS und DHS

In Anwesenheit von 40 μM Spermidin als festem Substrat wurde die Putrescin-Kinetik in Gegenwart von 30 und 100 μM 1,3-Diaminopropan untersucht. Die Ergebnisse sind als Lineweaver-Burk-Diagramme in den Abb. 3.39 und 3.40 wiedergegeben. Die Hemmung ist für beide Enzyme eindeutig kompetitiv, das heißt 1,3-Diaminopropan konkurriert mit Putrescin um die gleiche Bindungsstelle am aktiven Zentrum. Das Ergebnis war zu erwarten, da 1,3-Diaminopropan Substrat beider Enzyme ist. Die entsprechenden Hemmkonstanten liegen bei 35,6 μM (HSS) (Abb. 3.39 rechts) bzw. 39,7 μM (DHS) (Abb. 3.40 rechts).

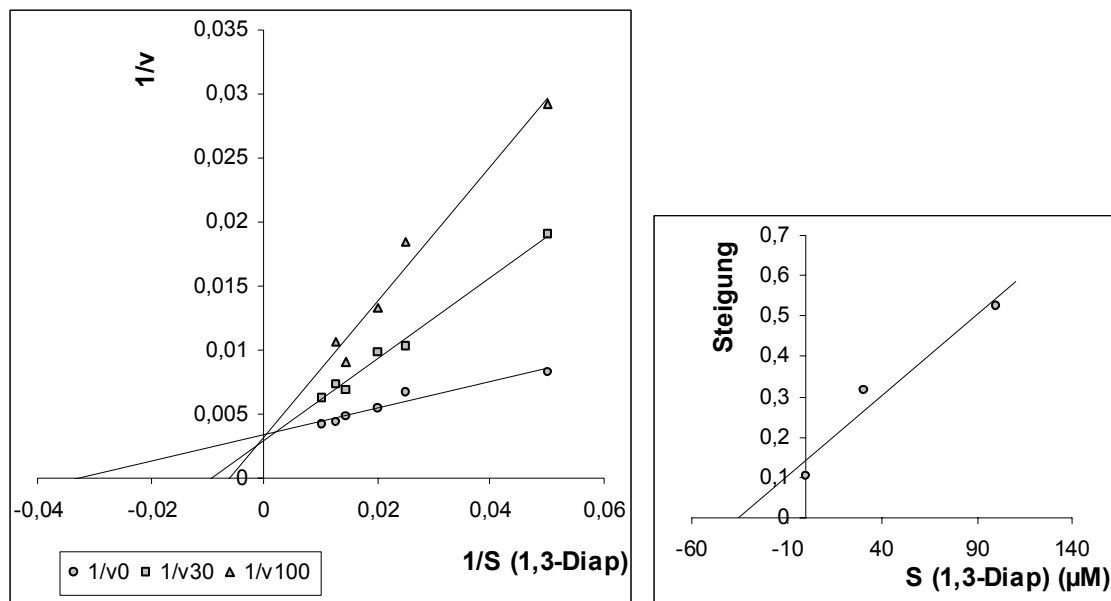


Abb. 3.39 links: kompetitive Hemmung des Putrescin-Umsatzes der HSS durch 1,3-Diaminopropan. Die Auswertung der Kinetiken erfolgte mit Radio-DC (2.6.1), die Abbildung in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk. Abb. 3.39 rechts: Ermittlung der Hemmkonstanten im Sekundärplot durch Auftrag der Geradensteigungen der Lineweaver-Burk-Darstellung über der Hemmstoffkonzentration. K_i für 1,3-Diaminopropan: 35,6 μM

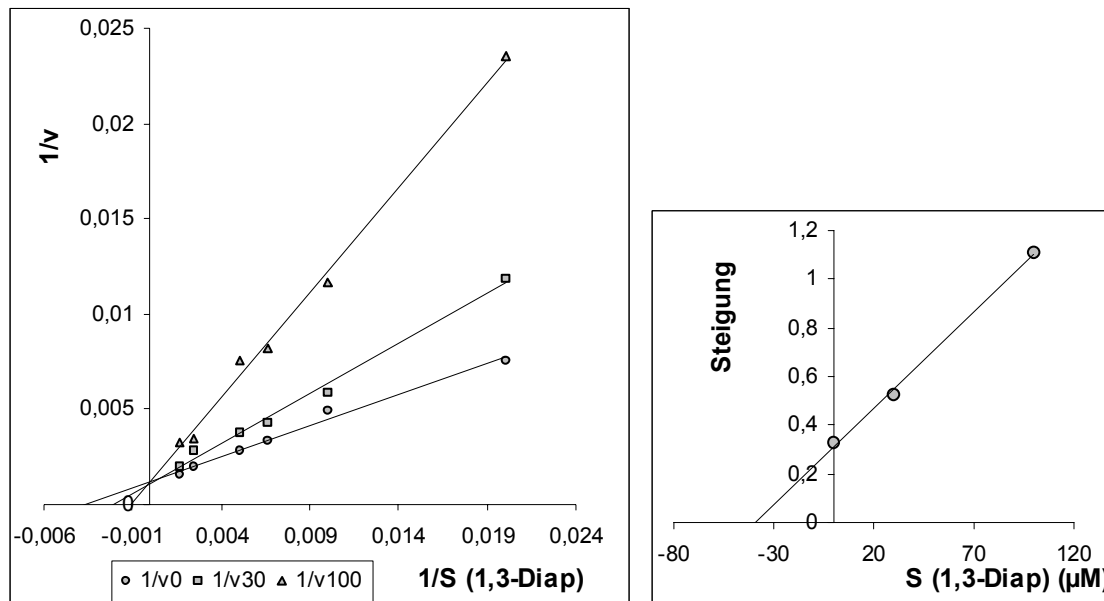


Abb. 3.40 links: kompetitive Hemmung des Spermidin-Umsatzes der DHS durch 1,3-Diaminopropan (1,3-Diap) in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk. Die Auswertung der Enzymkinetiken erfolgte mit der Radio-DC (2.6.1). Abb. 3.40 rechts: Bestimmung der Hemmkonstanten K_i für 1,3-Diaminopropan für die DHS im HSS-Assay (Darstellung analog Abb. 3.39). Es wurden Hemmstoffkonzentrationen von 0, 30 und 100 μM eingesetzt. K_i für 1,3-Diaminopropan: 39,7 μM

Beeinflussung der Substratkinetik von Spermidin durch 1,3-Diaminopropan bei DHS

In diesem Versuch sollte überprüft werden, in welchem Maße 1,3-Diaminopropan die Rolle des Spermidin als Aminobutyldonor beeinflusst. Die Messungen wurden in Gegenwart einer festen Konzentration an eIF5A von 10 μM durchgeführt. Das Ergebnis ist als Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.41 wiedergegeben. Auch hier ist eine eindeutig kompetitive Hemmung des Spermidin-Umsatzes durch 1,3-Diaminopropan zu erkennen. Dies bedeutet, dass das Diamin mit Spermidin um dessen Bindungsstelle am aktiven Zentrum konkurriert. Der K_i -Wert liegt mit 14,8 μM sogar niedriger als bei der Kompetition mit Putrescin.

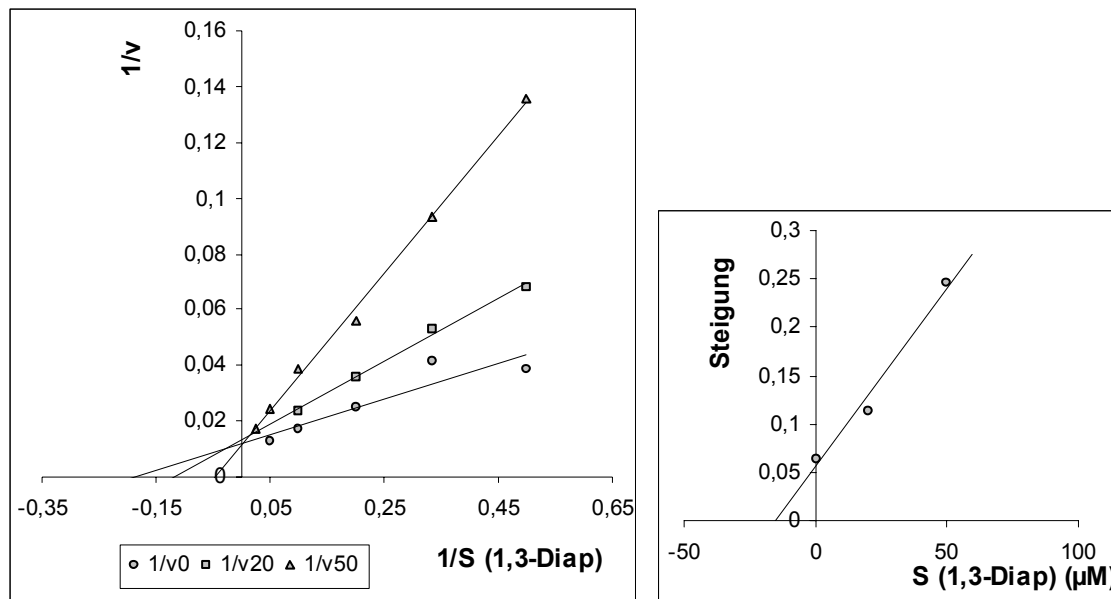


Abb. 3.41 links: kompetitive Hemmung des Spermidin-Umsatzes der DHS durch 1,3-Diaminopropan. Die Auswertung der Kinetiken erfolgte mit Flüssigszintillation (2.6.2). Abb. 3.41 rechts: Bestimmung der Hemmkonstanten K_i für 1,3-Diaminopropan für DHS (Darstellung analog Abb. 3.39). Die ermittelte Hemmkonstante K_i betrug $14,8 \mu\text{M}$.

Beeinflussung der Substratkinetik von eIF5A durch Putrescin bei DHS

In einem weiteren Wettbewerbsversuch wurde die Hemmung der Umsetzung von eIF5A durch 1 und 3 mM Putrescin untersucht. Die Spermidin-Konzentration betrug in jedem Ansatz $10 \mu\text{M}$. Das Ergebnis (Abb. 3.42 links) zeigt ebenfalls eine kompetitive Hemmung, die belegt, dass Putrescin und eIF5A um die gleiche Bindungsstelle am aktiven Zentrum konkurrieren. Der hohe K_i -Wert von $277 \mu\text{M}$ zeigt, dass der eIF5A eine wesentlich höhere Affinität zum Bindungszentrum hat als Putrescin. Dies belegen auch die unterschiedlichen K_M -Werte beider Substrate: $2,2 \mu\text{M}$ für den eIF5A und $297 \mu\text{M}$ für Putrescin (Tab. 3.12).

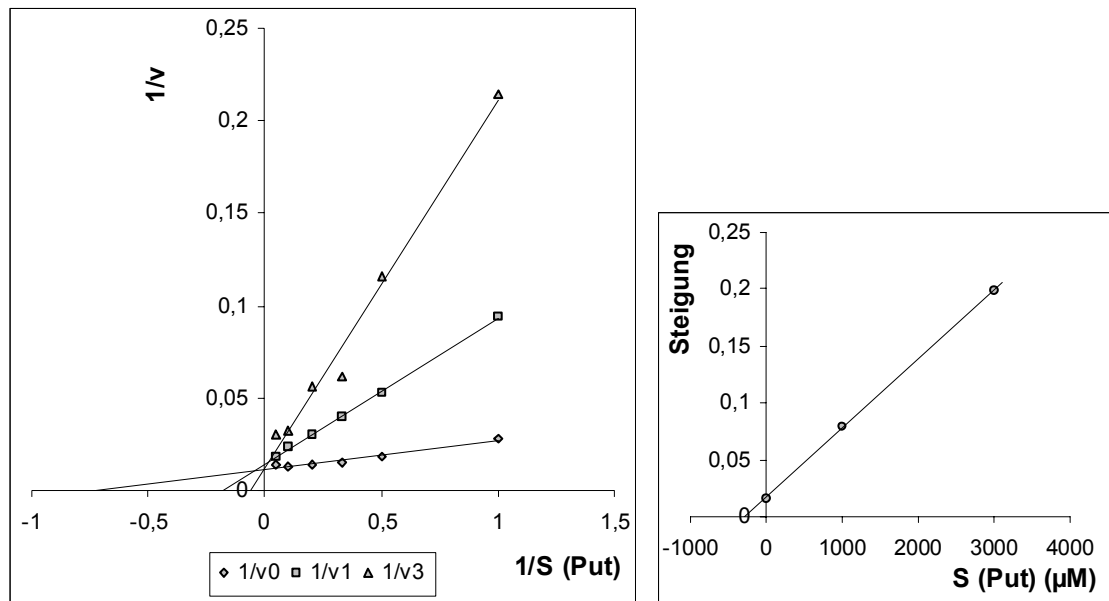


Abb. 3.42 links: Kompetitive Hemmung des eIF5A-Umsatzes der DHS durch Putrescin in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk. Die eingesetzten Hemmstoff-konzentrationen betrugen 0, 1 und 3 mM Putrescin. Die Auswertung der Kinetiken erfolgte mit der Flüssigszintillation (2.6.2). Abb. 3.42 rechts: Ermittlung der Hemmkonstanten K_i für Put: 276,7 μM (Darstellung wie Abb. 3.39).

Beeinflussung der Substratkinetik von Putrescin durch eIF5A bei DHS

Im gegenläufigen Ansatz wurde die Verdrängung des Putrescins durch steigende eIF5A-Konzentrationen untersucht. Das Experiment wurde unter sonst exakt den gleichen Bedingungen durchgeführt wie im vorausgegangenen Experiment. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.43 wiedergegeben. Im Gegensatz zum gegenläufigen Ansatz (Abb. 3.42) folgt die Beeinflussung des Putrescinumsatzes in Gegenwart fester eIF5A-Konzentrationen einer nichtkompetitiven Kinetik. Das bedeutet, dass Putrescin mit steigenden Konzentrationen den eIF5A nicht vom Bindungszentrum verdrängen kann. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass der eIF5A als Protein an der Proteinoberfläche der DHS andocken muss, bevor der spezifische Lysinrest am aktiven Zentrum bindet. Die nichtkompetitive Hemmkinetik besagt, dass zwischen dem Andocken des eIF5A an der DHS-Proteinoberfläche und dem Binden von Putrescin keinerlei Konkurrenz besteht. DHS-Moleküle mit gebundenem eIF5A sind für Putrescin auch bei hohen Konzentrationen nicht zugänglich.

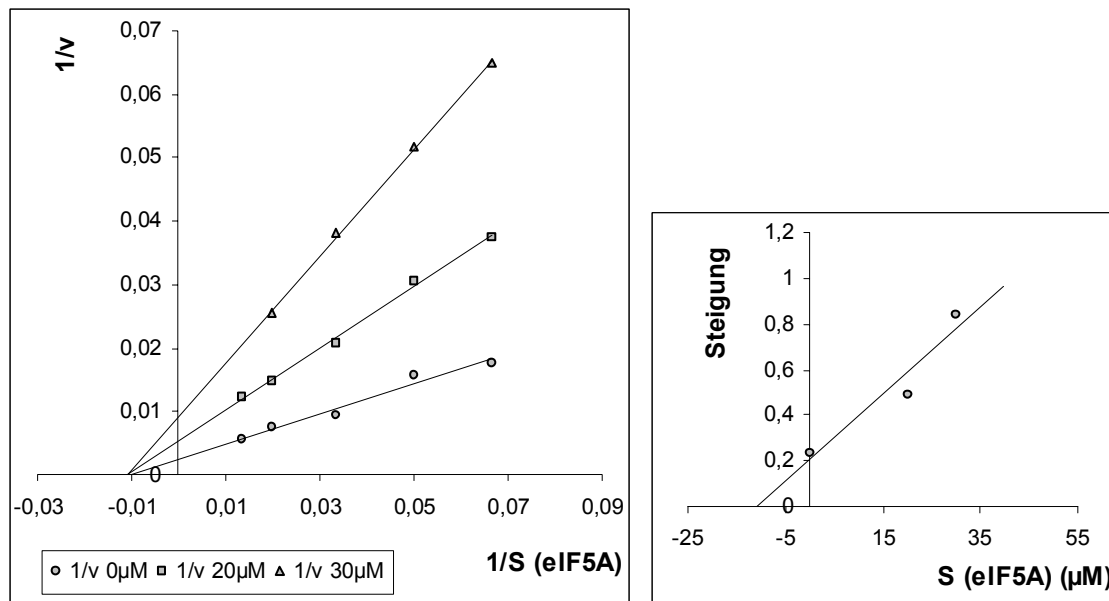


Abb. 3.43 links: Nichtkompetitive Hemmung des Putrescin-Umsatzes der DHS durch eIF5A. Die Auswertung der Kinetiken erfolgte mit Radio-DC (2.6.1), die Auftragung der kinetischen Daten in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk. Abb. 3.43 rechts: Ermittlung der Hemmkonstanten K_i für eIF5A: 10,7 μM (Darstellung wie in Abb. 3.39).

Beeinflussung der Substratkinetik von Putrescin durch eIF5A bei HSS

Die HSS akzeptiert den eIF5A nicht als Substrat. Dies kann daran liegen, dass das aktive Zentrum für den spezifischen Lysinrest nicht zugänglich ist oder aber daran, dass der eIF5A nicht mehr an der Proteinoberfläche andocken kann. Eine Klärung sollte ein Versuch zur Beeinflussung des Putrescin-Umsatzes durch den eIF5A bringen. Der Versuch wurde exakt so durchgeführt wie bei der DHS. Das in Abbildung 3.44 dargestellte Ergebnis zeigt, dass die Putrescin-Kinetik durch verschiedene eIF5A-Konzentrationen überhaupt nicht beeinträchtigt wird. Dies ist nur zu erklären, wenn man annimmt, dass die HSS die Fähigkeit zur Bindung an der Faktoroberfläche verloren hat, der eIF5A also nicht mehr an der Proteinoberfläche andocken und damit auch nicht mehr als Substrat dienen kann.

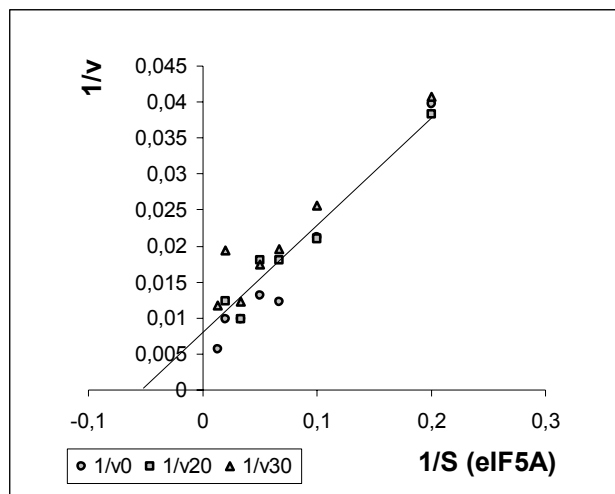


Abb. 3.44 Hemmung der HSS durch eIF5A. Die Auswertung der Kinetiken erfolgte mit der Radio-DC. Die Darstellung der kinetischen Daten erfolgte im Lineweaver-Burk-Diagramm. Es konnte kein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Eigenschaften von DHS und HSS

Eine Homospermidinsynthese wurde erstmalig von TAIT (1979) beschrieben, und zwar die aus dem Purpurbakterium *Rh. viridis*. Die erste pflanzliche HSS wiesen SRIVENUGOPAL und ADIGA in *Lathyrus sativus* nach (1980). Durch Fütterungsexperimente mit markierten Tracern an Pflanzen der Gattung *Senecio* konnte Homospermidin als das Grundgerüst der Pyrrolizidinalkaloide ermittelt werden (KAHN und ROBINS, 1981a,b, 1985). Somit war die pflanzliche HSS als Schlüsselenzym der PA-Biosynthese identifiziert. Immunologische Untersuchungen von OBER (1997) und Klonierung der bakteriellen HSS aus *Rh. viridis* (THOLL, 1996) und der pflanzlichen HSS aus *S. vernalis* (OBER und HARTMANN, 1999b) in unserem Arbeitskreis zeigten, dass pflanzliche und bakterielle HSS nicht genetisch miteinander verwandt sind. Nach Abgleich von Peptidsequenzen der gereinigten HSS aus Wurzelorgankulturen von *Senecio vernalis* mit Datenbanksequenzen stellte OBER (1997) erstmals einen Bezug der pflanzlichen HSS zum Enzym Desoxyhypusinsynthese (DHS) aus Hefe und *N. crassa* her, deren Aminosäuresequenzen erstaunliche Homologien zur HSS aus *S. vernalis* aufwiesen. OBER und HARTMANN (1999b) konnten den hohen genetischen Verwandtschaftsgrad zwischen pflanzlicher HSS und DHS aus *S. vernalis* eindeutig belegen, so dass die These formuliert wurde, die HSS sei durch Genduplikation aus der DHS hervorgegangen. Die biochemischen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese These stützen. Die folgende Tabelle 4.1 stellt die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zur HSS und DHS aus *S. vernalis* den Ergebnissen aus anderen Veröffentlichungen zu verschiedenen DHS gegenüber.

Eigenschaft	HSS (S. v.)	DHS (S.v.)	<i>N. tabacum</i>	Mensch	Ratte	Hefe	<i>N. crassa</i>
MW [kDa]							
nativ 1	174 8	180 8	190 9	150 11	160-180 15	165 16	180 20
UE app. (SDS) 2	4x44,5 8	4x45 8	4x42,7 9	4x40 12 4x41 11	4x42 15	4x43 16,17	4x40 20
gem. AS-Seq. 3	40,7 8	41,4 8	42,07 9	41,06 12 , 40,97 13	---	42,89 16 42,90 17	38,99 21
Zahl der AS 4	370 8	371 8	379 9	368 12 ; 369 13, 14	381 24	387 16,17	353 21
Homologie [%] im Vergleich zur AS-Sequenz der S.v.-DHS	79 8	(100)	80 8	61 8	---	58 8	60 8
pI [pH]	5,0-5,5 10	---	---	---	4,7 15	---	---
Cosubstrat	NAD ⁺	NAD ⁺	NAD ⁺	NAD ⁺	NAD ⁺	NAD ⁺	NAD ⁺
pH –Optimum [pH]	9,25	9,25 28	--- 25	9,0 11	9,5-9,6 15	---	9,0 22
DHS-Assay:K _M für							
Spd [μM]	---	7,0	11,0 / 8,0 26a	7,2 19	4,5 19	6,1; 8,3; 12,5 18	---
NAD ⁺ [μM]	---	---	---	4,8 19	40 19	720; 560; 810 18	---
eIF5A [μM]	---	2,2	1,5 / 1,0 26b	0,6 13	0,4 13	0,9; 3,1; 1,9 18	0,5 23
HSS-Assay:K _M für							
Put[μM] 5	137,1; 176,1; 195,9	197; 1678; 1276	---	---	---	---	---
Spd [μM] 6	99,7; 65,2; 56	4,8; 26,6; 130,6	391 / 287 26c	---	---	---	---
Hspd [μM] 7	7,2; 29,8; 116,0	6,5; 31,0; 54,2	1,0 mM; 35,5 mM 26d	---	---	---	---
NAD ⁺ [μM]	3,0 10	---	---	---	---	---	---
Wechselzahl (turnover- number) [s ⁻¹]	3,2x10 ⁻²	a 3,2x10 ⁻² b 2,4x10 ⁻³	2,4x10 ⁻³ - 1,5x10 ⁻² 9	1,0x10 ⁻² 9	9,6x10 ⁻⁵ 9	2,1x10 ⁻² 9	7,0x10 ⁻⁴ 9
K _i [μM]							
1,3-Diap	35,6	14,8 / 39,7	---	---	---	12,9 27	---
Put	---	276,7	---	---	---	27a	---
eIF5A-(Lys)	n. d.	10,7	---	---	---	---	---

Tab. 4.1 Eigenschaften von DHS und HSS aus *S. vernalis* und verschiedener DHS (Tabelle modifiziert nach OBER, 1997). Die Zahlen geben die Quellen an, fehlende Angaben wurden durch „---“, kenntlich gemacht.

- 1** Abschätzung des nativen Molekulargewichts über Größenausschlußchromatographie
- 2** Abschätzung über SDS-PAGE
- 3** aus der AS-Sequenz des sequenzierten Proteins berechnetes Molekulargewicht
- 4** Anzahl der AS einer Untereinheit (AS im offenen Leserahmen des sequenzierten Gens)
- 5** K_M -Werte im HSS-Assay mit 40, 400 bzw. 1000 μ M Spermidin in dieser Reihenfolge
- 6** K_M -Werte im HSS-Assay mit 40, 400 bzw. 1000 μ M Putrescin in dieser Reihenfolge
- 7** K_M -Werte im HSS-Assay mit 40, 400 bzw. 1000 μ M Putrescin in dieser Reihenfolge
- 8** OBER und HARTMANN 1999a
- 9** OBER und HARTMANN, 1999b
- 10** OBER, 1997, Diss.
- 11** KLIER et al., 1995b
- 12** YAN et al., 1996
- 13** JOE et al., 1995
- 14** BEVEC et al, 1996a
- 15** WOLFF et al., 1995
- 16** KANG et al., 1995
- 17** SASAKI et al., 1996, Bestimmung des MW der Untereinheit mit SDS-PAGE mit *S. carlsbergensis*
- 18** KANG et al., 1995 K_M -Werte wurden mit den Substraten ec-eIF5A (hum), eceIF5Aa (yeast) und eceIF5Ab (yeast) in dieser Reihenfolge bestimmt
- 19** JOE et al., 1995; K_M -Wertbestimmung mit ec-eIF5A (hum) als Substrat
- 20** TAO und CHEN, 1995a
- 21** TAO und CHEN, 1995b
- 22** TAO et al, 1994
- 23** bestimmt mit dem modifizierten Substrat 6xHis-NC21K (TAO et al., 1994)
- 24** bestimmt aufgrund einer Aminosäureanalyse (WOLFF et al., 1995)
- 25** keine Bestimmung des pH-Optimums beschrieben, jedoch erfolgte die Inkubation des Enzyms bei pH 9,5 (KANG et al., 1995; SASAKI et al., 1996)
- 26** OBER, persönl. Mitteilung (**26a**: L.-B./Hanes, bestimmt mit 1mM Spermidin ; **26b**: bestimmt mit 40, 400 μ M Putrescin im Puffer; **26c**: L.-B./Hanes, bestimmt mit 40 μ M eIFnt1 im Puffer; **26d**: L.-B./Hanes, bestimmt mit 40 μ M Spermidin im Puffer)
- 27** ABID et al., (1996), 27a: <50% Hemmung mit 1 mM [Put]
- 28** HSS-Reaktion

Auffällige Gemeinsamkeit beider Enzyme ist neben dem Reaktionsmechanismus und der Eigenschaft, NAD^+ als Cofaktor zu verwenden, die Tatsache, dass beide Homotetramere sind, deren vier Untereinheiten jeweils 41,4 (DHS) bzw. 40,7 kDa (HSS) groß sind und aus 371, bzw. 370 Aminosäuren bestehen. Die Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenz beträgt 79 %, was anzeigt, daß sich die HSS im Laufe der Evolution nicht stark verändert hat. Das pH-Optimum in der HSS-Reaktion liegt für beide Enzyme bei 9,25, ein pH-Wert, der im Rahmen dessen liegt, was für die DHS aus verschiedenen Organismen in der DHS-Reaktion auch ermittelt wurde. Im HSS-Assay haben beide Enzyme eine Wechselzahl (turnover-number) von $3,2 \times 10^{-2} \times \text{s}^{-1}$, die DHS im DHS-Assay von $2,4 \times 10^{-3} \times \text{s}^{-1}$, eine Wechselzahl, die noch um den Faktor 13 niedriger liegt, als die der HSS-Reaktion, aber im Rahmen dessen liegt, was für andere DHS ermittelt wurde (s. Tab. 4.1). Die folgende Tabelle 4.2 fasst die Hauptreaktionen der bakteriellen und der pflanzlichen HSS und der DHS zusammen.

bakterielle HSS (<i>Rhodopseudomonas viridis</i>) (EC 2.5.1.44)					
Put	+	Put	→	Hspd	+ NH_3
Put	+	Spd	→	Hspd	+ 1,3-Diap
pflanzliche HSS (<i>Senecio vernalis</i>) (EC 2.5.1.45)					
Put	+	Spd	→	Hspd	+ 1,3-Diap
pflanzliche DHS (<i>Senecio vernalis</i>) (EC 2.5.1.46)					
eIF5A-Lys	+	Spd	→	eIF5A-Dhyp	+ 1,3-Diap
(Put	+	Spd	→	Hspd	+ 1,3-Diap)
(Nebenaktivität)					

Tab. 4.2 Schema der von der bakteriellen HSS, der pflanzlichen HSS und der pflanzlichen DHS katalysierten Hauptreaktionen

4.2 Untersuchungen zur Substratspezifität von DHS und HSS

In der vorliegenden Arbeit sollten die Substratspektren von DHS und HSS in der HSS-Reaktion vergleichend betrachtet werden. Die folgende Tabelle 4.3 fasst die von beiden Enzymen katalysierten Reaktionen zusammen.

<u>C₃</u>	+			<u>C₃C₄</u>	+	C ₃ / <u>C₄</u>
<u>C₄</u>	+		→	<u>C₄C₄</u>	+	C ₃ / <u>C₄</u>
<u>C₅</u>	+	<u>C₄C₃ / C₄C₄</u>		<u>C₅C₄</u>	+	C ₃ / <u>C₄</u>
<u>C₃C₄</u>	+		→	<u>C₄C₃C₄</u>	+	C ₃ / <u>C₄</u>
<u>C₄C₄</u>	+			<u>C₄C₄C₄</u>	+	C ₃ / <u>C₄</u>

Tab. 4.3 Übersicht über die von DHS und HSS im HSS-Assay katalysierten Reaktionen. Grau unterlegt ist jeweils der Aminobutylakzeptor, unterstrichen die ¹⁴C-markierte Aminobutylakzeptorhälfte.

C₃ = 1,3-Diaminopropan, C₄ = Putrescin, C₅ = Cadaverin, C₃C₄ = Spermidin, C₄C₄ = Homospermidin, C₅C₄ = Aminobutylcadaverin, C₄C₃C₄ = Canavalmin, C₄C₄C₄ = Homospermin

Die HSS setzt Putrescin und Spermidin zu Homospermidin und 1,3-Diaminopropan um, indem sie den Aminobutylrest des Spermidins auf Putrescin überträgt. Spermidin kann, anders als bei der HSS aus *R. viridis*, nicht durch Putrescin als Aminobutylakzeptor ersetzt werden. Neben Putrescin können jedoch auch 1,3-Diaminopropan und 1,5-Diaminopentan (Cadaverin) als Aminobutylakzeptoren fungieren. Im Fall des 1,3-Diaminopropans konnte Spermidinbildung bei Inkubation mit [¹⁴C]Homospermidin beobachtet werden. Dieselbe Reaktion wird sicher auch mit [¹⁴C]Spermidin und 1,3-Diaminopropan erfolgen, was jedoch mit den im Aminobutylrest markierten radioaktiven Tracern nicht feststellbar war. Die leichte Austauschbarkeit von Putrescin durch 1,3-Diap ist durch die strukturelle Ähnlichkeit beider Substrate erklärbar. Das wird auch deutlich bei der Durchführung der Wettbewerbsversuche: Bei beiden Enzymen wird der Putrescin-Umsatz durch 1,3-Diaminopropan in der HSS- und DHS-Reaktion kompetitiv gehemmt (Kap. 3.14).

Die Bildung von 4-Aminobutylcadaverin wird von beiden Enzymen katalysiert, läuft jedoch weit weniger effizient ab, als die Homospermidin-Bildung oder Spermidin-Neubildung (Kap. 3.11). Das Reaktionsprodukt 4-Aminobutylcadaverin wurde bereits in Wurzelknöllchen von *Vigna angularis*, der Adzukibohne, nachgewiesen

(FUJIHARA et al., 1995). Die Fähigkeit, das 4-Aminobutylcadaverin zu bilden, wird dort allerdings nicht einem pflanzlichen Enzym zugeschrieben, sondern der bakteriellen Homospermidinsynthase, aus *Bradyrhizobium japonicum*, den mit der Pflanze vergesellschafteten Knöllchenbakterien (s. Tab. 4.2). In den Bakteroidenzellen findet sich neben 4-Aminobutylcadaverin auch Homospermidin in größeren Konzentrationen, während sich diese beiden Triamine im Cytosol der Pflanzenzelle nur in geringen Mengen finden. Die Substrate Putrescin und Cadaverin finden sich hauptsächlich im Cytosol der Pflanzenzelle und werden von dort in die Bakteroidenzellen eingeschleust, so dass hier die Bildung des Homospermidins und 4-Aminobutylcadaverins nur durch die Symbiose beider Organismen verwirklicht wird.

Die beiden Diamine 1,6-Diaminohexan und 1,7-Diaminoheptan werden weder von der DHS noch von der HSS als Aminobutylakzeptoren in der HSS-Reaktion verwendet.

Bei der Inkubation beider rekombinanten Enzyme aus *Senecio vernalis* mit Spermidin oder Homospermidin ohne ein zweites Substrat wurde die Bildung von Canavalmin bzw. Homospermin beobachtet, was durch den Transfer einer Aminobutyleinheit auf Spermidin bzw. Homospermidin zu erklären ist. Die Bildung dieser längerkettigen Polyamine durch die DHS und die HSS ist bisher nicht beschrieben worden. Hingegen wurde in Abwesenheit des eIF5A-Vorläuferproteins die Spaltung von Spermidin zu 1,3-Diaminopropan und 1-Pyrrolin durch die DHS beobachtet (WOLFF et al., 1990). BÖTTCHER et al. (1994) beobachteten ebenfalls die Spaltung von Spermidin und die Entstehung geringer Mengen 1,3-Diaminopropan in Abwesenheit von Putrescin bei der pflanzlichen HSS aus *Eupatorium cannabinum*. Während die Mengen an Canavalmin und Homospermin bei Inkubation der HSS mit Spermidin bzw. Homospermidin gering sind, ebenso wie bei der Inkubation der DHS mit Homospermidin, entstehen bei der Inkubation der DHS mit Spermidin größere Mengen Canavalmin (s. 3.11).

Die Bildung von 1-Pyrrolin, welches spontan aus frei werdendem 4-Aminobutanal entsteht, wurde besonders bei der Inkubation der HSS mit Spermidin und ohne zweites Substrat mit Aminobutylakzeptorfunktion beobachtet, jedoch konnte auch bei der Inkubation der HSS mit Homospermidin sowie bei Inkubation der DHS mit Spermidin bzw. Homospermidin 1-Pyrrolin nachgewiesen werden. Die NAD⁺-abhängige Spaltung von Spermidin in 1,3-Diap und 1-Pyrrolin in Abwesenheit des

Aminobutylakzeptors eIF5A durch die DHS aus Rattenhoden beschrieben auch WOLFF et al. (1990). Das als Produkt identifizierte Tetraamin Canavalmin konnte bereits in verschiedenen Arten der Gattung *Canavalia*, einer Leguminose, (FUJIHARA et al., 1986) nachgewiesen werden. Diese enthält Homospermidin nur in den Wurzelknöllchen und in den Samen und Spermidin in allen untersuchten Geweben. Canavalmin wird nur in den Samen und in alternden Wurzelknöllchen gefunden. Da die Autoren einen aktiven Polyamintransport in der Pflanze ausschließen, muss Canavalmin an den jeweiligen Fundorten (Samen und Wurzelknöllchen) gebildet werden. Das hierfür verantwortliche Enzym könnte nach Betrachtung unserer Ergebnisse eine HSS oder eine DHS sein. Es wird vermutet, dass die erheblichen Mengen Homospermidin, die in den Wurzelknöllchen gefunden werden, eine zentrale Funktion für das Wachstum und die Entwicklung der Bakterien in der Wirtspflanze besitzen (FUJIHARA et al., 1986). Ob das Homospermidin von der Wirtspflanze gebildet wird, um das Bakterienwachstum anzuregen, oder von den Bakterien, um das Wachstum der Pflanze zu regulieren, konnte nicht differenziert werden. Homospermin konnte bereits in schnellwachsenden Wurzelknöllchenbakterien der Gattung *Rhizobium*, in Symbiose mit der Sojabohne, entdeckt werden (FUJIHARA und HARADA, 1989). Neben Homospermin konnten auch erhebliche Mengen Homospermidin gefunden werden, während der Spermidin-Gehalt, verglichen mit dem Spermidin-Gehalt in langsamwachsenden *Rhizobium*-Arten niedrig war. Im Gegensatz zu langsamwachsenden *Rhizobium*-Arten, die kein Homospermin enthalten, sind schnellwachsende *Rhizobium*-Arten salztolerant. Die Autoren vermuten in der Bereitstellung dieses Tetraamins eine spezifische Antwort der Bakterienzellen auf Stress durch erhöhte Salzkonzentrationen. Das für die Synthese von Homospermidin und Homospermin verantwortliche Enzym könnte auch hier die bakterielle HSS sein. HAMANA et al. (1992) konnten neben anderen Polyaminen Canavalmin und Homospermin in reifen Samen von *Pisum sativum* nachweisen, außerdem Homospermin in Blättern einer Wasserhyazinthe, *Eichhornia crassipes* (HAMANA et al., 1994). Die Autoren mutmaßen, dass die Biosynthese des Homospermins, über die Aminobutylierung des ebenfalls in *E. crassipes* enthaltenen Homospermidins abläuft, machen jedoch keine Angaben darüber, welches Enzym dafür verantwortlich sein könnte. Für das ebenfalls in *E. crassipes* und in vielen anderen Wasserpflanzen vorkommende Aminopropylhomospermidin ($C_3C_4C_4$) nehmen die Autoren als verantwortliches Enzym eine Sperminsynthase an, die als

Aminopropyltransferase den Aminopropylrest nicht nur auf das Aminobutylende des Spermidins überträgt und damit Spermin bildet, sondern den Aminopropylrest auch auf das Aminobutylende des Homospermidins überträgt.

Die pflanzliche HSS kann, im Gegensatz zu den von BÖTTCHER (1994) angegebenen Daten, nicht aus zwei Molekülen Putrescin Homospermidin erzeugen, sondern benötigt hierzu Spermidin oder Homospermidin als Aminobutyldonor. Damit hat sie ein anderes Substratspektrum als die bakterielle HSS aus *R. viridis*, mit der sie nicht genetisch verwandt ist (s. Tabelle 4.2). BÖTTCHERS vermeintlich Spermidin-freie Reaktionsansätze mit HSS aus *E. cannabinum*, NAD^+ und Putrescin enthielten noch geringe Mengen Spermidin im Reinigungspuffer, so daß er Homospermidin-Bildung vermeintlich ohne Spermidin detektieren konnte. Diese Aktivität wäre in einem nur Putrescin enthaltenden Ansatz nicht zu beobachten gewesen (s. auch Kap. 3.5). ABID et al. (1996) stellten fest, dass Putrescin in der DHS-Reaktion der DHS aus *Saccharomyces carlsbergensis* nicht als Aminobutyldonor für das eIF5A-Vorläuferprotein dienen kann. Ob Putrescin als Aminobutyldonor für die DHS aus *S. vernalis* im DHS-Assay dienen kann, wurde nicht getestet. Die vorliegenden Ergebnisse lassen es jedoch wenig wahrscheinlich erscheinen.

4.3 Substratkinetiken

Die nachfolgende Tabelle 4.4 fasst noch einmal die apparenten K_M -Werte für die Substrate der durch DHS und HSS katalysierten Reaktionen zusammen.

Substrat I (variable Konz.)	Substrat II (feste Konz.)	DHS	HSS
		K_M (app.) [μM]	K_M (app.) [μM]
Putrescin	Spermidin		
	40 μM	197,1	137,1
	400 μM	1680	176,1
	1000 μM	1276	195,9
Spermidin	Putrescin		
	40 μM	4,4	99,7
	400 μM	26,6	65,2
	1000 μM	130,6	56
Homospermidin	Putrescin		
	40 μM	6,5	7,2
	400 μM	31,0	29,8
	1000 μM	54,2	116,0

Tab. 4.4 Gegenüberstellung der apparenten K_M -Werte für Putrescin, Spermidin und Homospermidin für die DHS und HSS

Man erkennt, dass die für beide Enzyme ermittelten K_M -Werte erstaunlich ähnlich sind. Auffällige Unterschiede finden sich nur in zwei Fällen. Die K_M -Werte für Putrescin in Gegenwart fester Spermidin-Konzentrationen unterscheiden sich bei der niedrigsten Spermidin-Konzentration (40 μM) mit 197 μM (DHS) bzw. 137 μM (HSS) kaum, weichen jedoch bei höheren Spermidin-Konzentrationen merklich voneinander ab. Während die Werte bei der HSS nur geringfügig zunehmen, ist der K_M -Wert für Putrescin bei 400 μM Spermidin mit 1680 μM im Vergleich zum K_M -Wert bei 40 μM Spermidin 8,5-fach erhöht. Dies deutet darauf hin, dass Spermidin bei der DHS

stärker als bei der HSS um die Bindungsstelle von Putrescin konkurriert. Das passt sehr gut zu der Beobachtung, dass Spermidin durch die DHS effizienter zu Canavalmin aminobutyliert wird als durch die HSS (s. Tab 3.7, 3.8). Die DHS scheint Spermidin etwas besser als die HSS als Aminobutyldonor zu verwenden. Der zweite Unterschied betrifft die K_M -Werte für Spermidin in Gegenwart der niedrigsten Putrescin-Konzentration (40 μM): 4,4 μM bei der DHS im Vergleich zu 100 μM bei der HSS. Dieser Unterschied um einen Faktor von über 20 schwächt sich allerdings bei der höheren Putrescin-Konzentration (400 μM) ab und liegt bei der HSS bei 65,2 μM und bei der DHS bei 26,6 μM und damit um einen Faktor von 2,5 höher. Die apparenten K_M -Werte für Homospermidin sind in Gegenwart aller festen Putrescin-Konzentrationen für beide Enzyme fast gleich.

Vergleicht man die K_M -Werte für beide Enzyme, so lassen sich trotz der besprochenen Unterschiede keine wirklich markanten Differenzen erkennen. Nimmt man die Übereinstimmungen in den Wechselzahlen bzw. den spezifischen Aktivitäten der hochgereinigten reinen Enzyme hinzu, so deutet vieles darauf hin, dass die HSS im Zuge ihrer Rekrutierung aus der DHS die HSS-Aktivität der DHS fast unverändert beibehalten hat.

4.4 Substrat-Kompetitionsversuche

Sowohl bei der DHS (DHS-Reaktion wie auch HSS-Reaktion) als auch bei der HSS wird der Putrescin-Umsatz durch 1,3-Diaminopropan kompetitiv gehemmt (K_i 14,8 μM , kompetitiv; 39,7 μM , kompetitiv bzw. 35,6 μM , kompetitiv) (s. 3.14). Da 1,3-Diaminopropan ebenfalls bei der NAD^+ -abhängigen Spaltung von Spermidin entsteht, handelt es sich hier um eine Produkthemmung der DHS- bzw. HSS-Reaktion. ABID et al. (1996) führten die biochemische Charakterisierung der DHS aus *Saccharomyces carlsbergensis* durch und konnten ebenfalls die Aminobutylierung des eIF5A durch 1,3-Diaminopropan kompetitiv hemmen. Eine Hemmung der Hefe-DHS-Aktivität durch Putrescin von 50 % wurde erst ab Konzentrationen von 1 mM Putrescin beobachtet, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt (s. auch Tab. 4.1): In dieser Arbeit konnte für Putrescin eine kompetitive Hemmung der DHS-Reaktion ermittelt werden (K_i : 276,7 μM). Umgekehrt

ist das eIF5A-Vorläuferprotein ein effektiver Hemmstoff der HSS-Reaktion der DHS (K_i : 10,7 μ M, nicht-kompetitive Hemmung), da das Enzym eine höhere Affinität zu seinem natürlichen Substrat hat als zum Diamin Putrescin, was die vorher gemachte Beobachtung bestätigt. Die nachfolgende Tabelle 4.5 fasst die Ergebnisse der Substratkompetitionsversuche zusammen.

Hemmstoff	DHS-Reaktion (DHS)	HSS-Reaktion (DHS)	HSS-Reaktion (HSS)
1,3-Diap	kompetitiv (K_i : 14,8 μ M) (K_M Spd)	kompetitiv (K_i : 39,7 μ M) (K_M Put)	kompetitiv (K_i : 35,6 μ M) (K_M Put)
eIF5A	-----	nichtkompetitiv (K_i : 10,7 μ M) (K_M Put)	keine Hemmung (K_M Put)
Putrescin	kompetitiv (K_i : 276,7 μ M) (K_M eIF5A)	-----	-----

Tab. 4.5 Hemmung der DHS und HSS durch 1,3-Diaminopropan, eIF5A und Putrescin. In Klammern ist das variable Substrat angegeben.

4.5 Schlussbetrachtung

Ist die HSS eine DHS, die ihre intrinsische Aktivität verloren hat?

Wie kann man erklären, dass die DHS ihre intrinsische Aktivität, d.h. die Aminobutylierung des eIF5A im Zuge ihrer Umwandlung in eine HSS verliert, ohne dass dabei die HSS-Aktivität nennenswert beeinflusst wird? Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass sich bei der Herausbildung der HSS aus der DHS das aktive Zentrum mit all seinen Bindungsstellen praktisch nicht verändert hat. Dafür spricht die nachgewiesene und oben diskutierte weitgehende Übereinstimmung der Substratkinetiken beider Enzyme. Wenn dies so ist, kann der Verlust der DHS-Aktivität nur bedeuten, dass die der Katalyse vorausgehende Bindung des eIF5A-Vorläuferproteins an die Proteinoberfläche der DHS bei der HSS nicht mehr möglich ist. Die im Rahmen dieser Arbeit durch die Substratkompetitionsversuche erbrachten Daten belegen die Richtigkeit dieser Annahme recht eindeutig (Tab. 4.4). Der

Befund, dass die Aminobutylierung des eIF5A durch die DHS durch Putrescin kompetitiv gehemmt wird zeigt deutlich, dass beide Substrate, das der DHS-Reaktion (eIF5A) und das der HSS-Reaktion (Putrescin) um dieselbe Bindungsstelle am aktiven Zentrum der DHS konkurrieren. Aufschlussreich ist das Ergebnis des gegenläufigen Versuchs, d. h., die Beeinflussung der Aminobutylierung von Putrescin durch das eIF5A-Vorläuferprotein. Hier wurde eine eindeutig nicht-kompetitive Hemmung beobachtet. Dies kann nur so interpretiert werden, dass der eIF5A den Putrescinumsatz durch Bindung an die DHS-Proteinoberfläche hemmt. Jedes DHS-Molekül, das ein eIF5A gebunden hat, ist für Putrescin, gleichgültig in welcher Konzentration im Ansatz, nicht mehr zugänglich. Eine Verdrängung kann nicht stattfinden, da Putrescin das Andocken des eIF5A nicht beeinflussen kann. Abgerundet und eindeutig klar wird die Situation durch die Beobachtung, dass im gleichen Versuch mit der HSS der eIF5A den Putrescin-Umsatz überhaupt nicht beeinflusst, also keine Hemmung zu beobachten ist. Das bedeutet, dass der eIF5A nicht an die HSS andocken kann, also die HSS die Fähigkeit zur Bindung des eIF5A verloren haben muss. LIAO et al. (1998) diskutieren für die menschliche DHS hydrophobe Wechselwirkungen mit dem eIF5A, die eine Bindung des Substratproteins an das Enzym ermöglichen.

Damit können wir abschließend feststellen, dass es sich bei der HSS tatsächlich um eine DHS handelt, die ihr eigentliches Substrat nicht mehr binden kann. Da wir es bei diesem Substrat mit einem Protein zu tun haben, dass nur dann als Substrat fungieren kann, wenn es so spezifisch an der DHS-Proteinoberfläche andocken kann, dass der spezifische Lysin-Rest als eigentliches Substrat der Aminobutylierung in das aktive Zentrum eingepasst wird, müssen wir einen Zweistufenprozess voraussetzen: 1. Das Andocken des Substratproteins, 2. die Aminobutylierung des spezifischen Lysinrests zum Desoxyhypusinrest. Vorgang 1 ist in der HSS defekt, wodurch Vorgang 2 nicht mehr möglich ist. Im Fall des niedermolekularen Putrescins entfällt Vorgang 1. Die HSS kann Putrescin deshalb unverändert wie die DHS umsetzen, da das katalytische Zentrum unverändert blieb.

Wir haben hier also ein Beispiel für die Evolution eines neuen Enzyms, bei dem keinerlei Optimierung und keine Anpassung an neue Erfordernisse erkennbar sind. Wir müssen lediglich eine Genduplikation annehmen, gekoppelt mit dem Verlust der Hauptaktivität (Aminobutylierung des eIF5A) und Erhalt der Nebenaktivität

(Aminobutylierung von Putrescin), die nun zur Hauptaktivität wird (Abb. 4.1). Natürlich erklärt dieser Vorgang nur die evolutive Entstehung eines neuen Enzyms, jedoch nicht die regulatorische Einbindung dieses Enzyms, der HSS, in den komplexen Ablauf der PA-Biosynthese.

Einziges bisher bekanntes Beispiel für ein Enzym des Sekundärstoffwechsels, das durch Genduplikation aus einem Primärstoffwechsellenzym entstanden sein könnte, ist die Putrescin-N-methyltransferase aus Tabak, die hohe Homologien zur Spermidin-Synthase aus *Nicotiana sylvestris*, *Hyoscyamus niger* und *Arabidopsis thaliana* aufweist (64-68 % auf DNA-Ebene) (HASHIMOTO et al. 1998). Die Homologien der pflanzlichen Spermidinsynthasen zur Putrescin-N-methyltransferase sind höher als die zu den Spermidin-Synthasen aus Säugern.

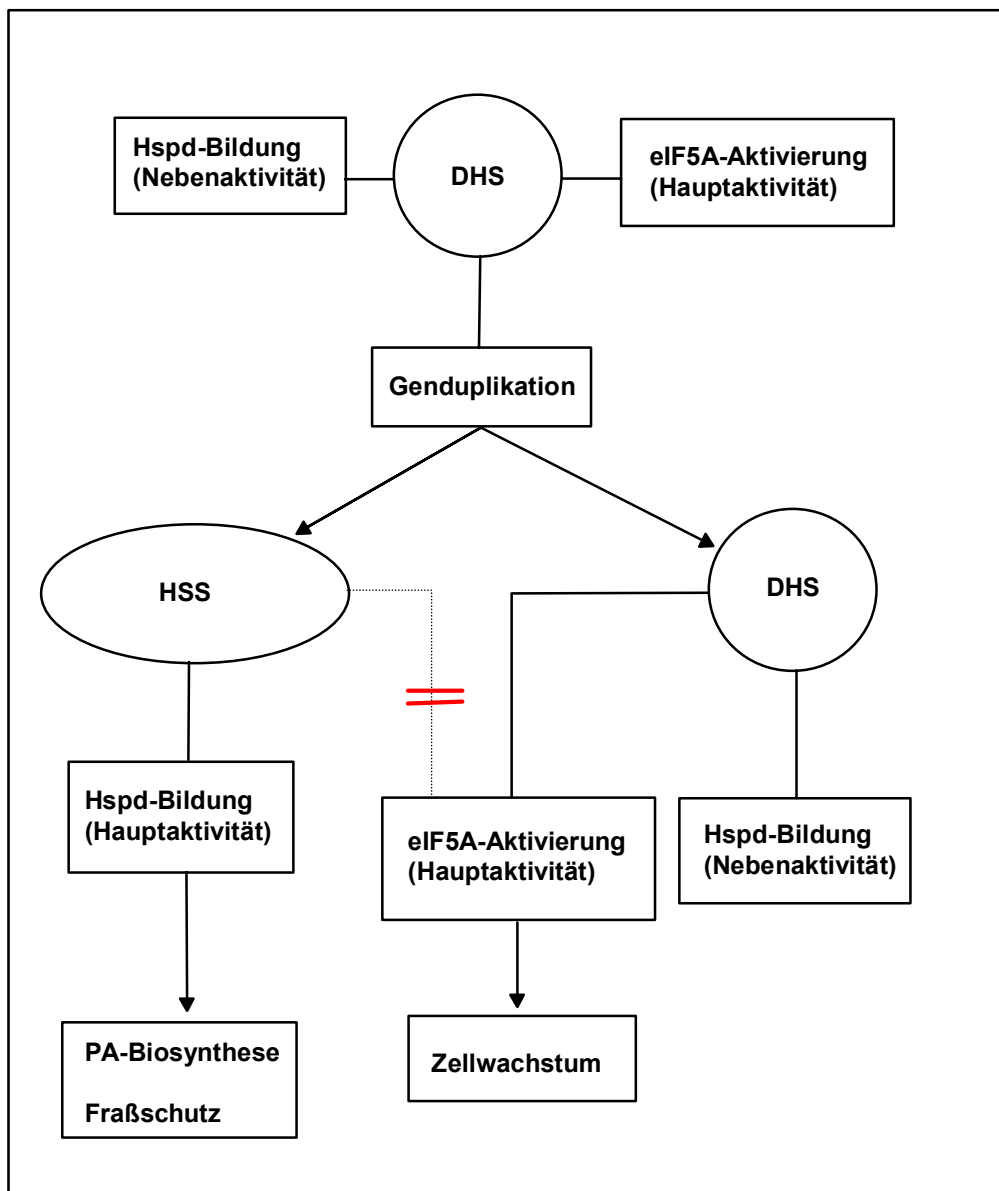


Abb. 4.1 Schema zum wahrscheinlichen Ursprung der pflanzlichen HSS. Während die DHS sich im Lauf der Evolution nicht oder kaum verändert hat, hat die HSS eine Entwicklung vom Faktor-aktivierenden Enzym zum Homospermidin-produzierenden Enzym erfahren. Die Nebenaktivität der Ur-DHS ist hierbei zur Hauptaktivität geworden, die den Pflanzen einen Überlebensvorteil verschafft, die gelernt haben, aus Homospermidin PA zu produzieren. Die Fähigkeit zur Aktivierung des eIF5A ist der HSS verlorengegangen.

5 Zusammenfassung

1. Aus *Escherichia coli* gewonnene rekombinante pflanzliche Desoxyhypusinsynthase (DHS) und Homospermidinsynthase (HSS) aus *Senecio vernalis* wurden durch ein dreistufiges säulenchromatographisches Verfahren bis zur SDS-gelelektrophoretischen Reinheit aufgereinigt.
2. Aus vorausgegangenen molekularbiologischen Untersuchungen ist klar, dass die HSS aus der DHS entstanden sein muß. Die DHS katalysiert als Hauptreaktion die Spermidin-abhängige Aminobutylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A). Bei dieser posttranslationalen Modifikation wird ein spezifischer Lysinrest im eIF5A-Vorläuferprotein zu einem Desoxyhypusinrest modifiziert. Die Reaktion wird als DHS-Reaktion bezeichnet. Die HSS katalysiert die Spermidin-abhängige Aminobutylierung von Putrescin unter Bildung von Homospermidin. Die Reaktion wird als HSS-Reaktion bezeichnet.
3. Zur Bestimmung der DHS-Aktivität wurde ein Filter-Absorptionsverfahren unter Einsatz von [^{14}C]Spermidin übernommen und für die anstehenden Fragestellungen optimiert. Die Bestimmung der HSS-Aktivitäten beider Enzyme erfolgte durch Einsatz von [^{14}C]Putrescin und Bestimmung des gebildeten [^{14}C]Homospermidins dünnnschichtchromatographisch oder durch HPLC und gekoppelter Radiodetektion.
4. Die pflanzliche HSS kann als Aminobutyldonor nur Spermidin, nicht aber Putrescin verwenden. Sie unterscheidet sich damit markant von der bakteriellen HSS.
5. Die wichtigsten allgemeinen Eigenschaften beider Enzyme lassen sich wie folgt zusammenfassen: Beide Enzyme zeigen für die HSS-Reaktion ein pH-Optimum von 9,25 im Glycin/NaOH-Puffer. Für die HSS-Reaktion wurde bei beiden Enzymen eine Wechselzahl (turnover-number) von $K_{\text{kat}} 0,032 \cdot \text{s}^{-1}$ gefunden, für die DHS-Reaktion ergab sich ein Wert von $K_{\text{kat}} 0,0024 \cdot \text{s}^{-1}$.
6. Die vergleichend für beide Enzyme untersuchte Substratspezifität der HSS-Reaktion ergab, dass neben Spermidin auch das Produkt Homospermidin als Aminobutyldonor fungiert und neben Putrescin auch seine nächsten

Homologen 1,3-Diaminopropan und 1,5-Diaminopentan (Cadaverin) als Aminobutylakzeptoren wirken. Überraschenderweise sind auch die beiden Aminobutylendonoren gleichzeitig in geringem Umfang Aminobutylakzeptoren. Die entsprechenden in geringen Mengen als Produkte entstehenden Tetraamine Aminobutylspermidin (Canavalmin) und Aminobutylhomospermidin (Homospermin) wurden mit GC-MS eindeutig identifiziert. Beide Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich der Substratspezifität qualitativ nicht.

7. Die apparenten K_M -Werte wurden für die HSS-Reaktion beider Enzyme für die Aminobutylendonoren Spermidin und Homospermidin in Gegenwart fester Putrescin-Konzentrationen (40 μ M, 400 μ M und 1000 μ M) sowie für den Aminobutylakzeptor Putrescin in Gegenwart fester Konzentrationen Spermidin (40 μ M, 400 μ M und 1000 μ M) bestimmt. Abgesehen von zwei Abweichungen ergaben sich für beide Enzyme erstaunlich übereinstimmende K_M -Werte.
8. Um Aufschluß über die Wechselwirkungen der Substrate am aktiven Zentrum beider Enzyme zu erhalten, wurden Substrat-Kompetitionsversuche sowohl für die HSS-Reaktionen als auch für die DHS-Reaktion durchgeführt. Dabei wurde als wichtigstes Ergebnis gefunden, dass Putrescin in der DHS-Reaktion die Aminobutylierung des eIF5A kompetitiv hemmt, während umgekehrt der eIF5A in der HSS-Reaktion die Aminobutylierung von Putrescin bei Katalyse durch die DHS nichtkompetitiv hemmt und der eIF5A bei Katalyse durch die HSS die Reaktion überhaupt nicht beeinflusst. Dies bedeutet, dass die HSS die Fähigkeit zur Bindung des eIF5A-Vorläuferproteins verloren haben muss.
9. Insgesamt bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse aus biochemischer Sicht, dass die HSS aus einer DHS hervorgegangen sein muss. Man kann die HSS als eine DHS auffassen, die die Fähigkeit zur Bindung des eIF5A verloren hat. In allen anderen enzymatischen Eigenschaften stimmen DHS und HSS überraschend gut überein. Daraus ist zu schließen, dass die HSS nach ihrer Entstehung aus einer DHS für ihre neue Aufgabe als Eingangsenzym einer Alkaloidbiosynthese in ihren Eigenschaften nicht verändert wurde.

6 Literaturverzeichnis

- ABID, M. R., SASAKI, K., TITANI, K. und MIYAZAKI, M. (1996) Biochemical and immunological characterization of deoxyhypusine synthase purified from yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Biochemistry* 121, 769-778
- ADOLPH, R. D. (1991) Stoffwechsel des Putrescins, der Vorstufe von Pyrrolizidinalkaloiden, in Wurzelkulturen von *Senecio vulgaris*. *Dissertation, TU Braunschweig*
- APELBAUM, A., CANNELAKIS, Z. N., APPLEWHITE, P. B., KAUR-SAWHNEY, R. und GALSTON, A. W. (1988) Binding of Spermidine to a Unique Protein in Thin-Layer Tobacco Tissue Culture. *Plant Physiology* 88, 996-998
- BEVEC, D., JAKSCHE, H., OFT, M., WÖHL, T., HIMMELSPACH, M., PACHER, A., SCHEBESTA, M., KOETTNITZ, K., DOBROVNIK, M., CSONGA, R., LOTTSPREICH, F. und HAUBER, J. (1996) Inhibition of HIV-1 Replication in Lymphocytes by Mutants of the Rev Cofactor eIF-5A. *Science* 271, 1858-1860
- BIEMANN, K. (1962) The mass spectra of isotopically labelled molecules. In: *Mass Spectrometry, Organic chemical Applications; McGraw-Hill Book Company, Inc. New York, San Francisco, Toronto, London: 204-250*
- BÖTTCHER, F. (1993) Nachweis, Reinigung und Charakterisierung der sym-Homospermidinsynthase, Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese in Wurzelkulturen verschiedener Asteraceae. *Dissertation, TU Braunschweig*
- BÖTTCHER, F., ADOLPH, R.D. und HARTMANN, T. (1993) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 32: 679-679
- BÖTTCHER, F., OBER, D. und HARTMANN, T. (1994) Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. *Can. J. Chem.* 72, 80: 80-85
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the method of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- BUSSE, J. und AULING, G. (1988) Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the *Proteobacteria*. *System. Appl. Microbiol.* 11, 1-8
- CHAMOT, D. und KUHLEMEIER, C. (1992) Differential expression of genes encoding the hypusine-containing translation initiation factor, eIF-5A, in tobacco. *Nucleic Acids Research* 20, 665-669

CHEN, K. Y. und LIU, A. Y.-C. (1981) differences in polyamine metabolism of the undifferentiated neuroblastoma cells. *FEBS Letters* 134, 71-74

CHEN, K. Y. (1983) An 18000-Dalton Protein Metabolically Labeled by Polyamines in Various Mammalian Cell Lines. *Biochimica et Biophysica Acta* 756, 395-402

CHEN, Z. P., YAN, Y. P., DING, Q. J., KNAPP, S., POTENZA, J. A., SCHUGAR, H. J. und CHEN, K. Y. (1996) Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. *Cancer Letters* 105, 233-240

COOPER, H. L., PARK, M. H., FOLK, J. E. (1982) Posttranslational Formation of Hypusine in a Single Major Protein Occurs Generally and is Associated with Activation of Lymphocyte Growth. *Cell* 29, 791-797

COOPER, H. L., PARK, M. H., FOLK, J. E., SAFER, B. und BRAVERMAN, R. (1983) Identification of the hypusine-containing protein Hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1854-1857

COOPER, T. G. (1980) Biochemische Arbeitsmethoden, . *Walter de Gruyter, Berlin, New York*

CROUT, D. H. G., DAVIES, N. M., SMITH, E. H. und WHITEHOUSE, D. (1972) Pyrrolizidine Alkaloids. Biosynthesis of Senecic Acid, *J. Chem. Soc., Perkin I*, 671-680

DANNINGER, T., HAGEMANN, U., SCHMITT, V. und SCHÖNHÖFER, P.S. (1983) Zur Toxizität Pyrrolizidinalkaloid-haltiger Arzneipflanzen. *Pharm. Zeitung* 128, 289-303

DONIKE, M. (1969) N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide. *J. Chrom.* 42: 103-104

EHMKE, A., VON BORSTEL, K. und HARTMANN, T. (1988) Alkaloid-N-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta* 176: 83-90

FLORES, H. E. GALSTON, A. W. (1982) Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69: 701-706

FREI, H., LUETHY, J., BRAUCHLI, J., ZWEIFEL, U., WÜRGLER, F. E., SCHLATTER, C. (1992) Structure /activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological interactions* 83 (1): 1-22

- FUJIHARA, S., NAKASHIMA, T. Und KUROGOCHI, Y. (1982) Occurrence of a new polyamine, Canavalline, in the sword bean *Canavalia gladiata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 107*, 403-410
- FUJIHARA, S., NAKASHIMA, T., KUROGOCHI, Y. Und YAMAGUCHI, M. (1986) Distribution and metabolism of sym-homospermidine and canavalline in the sword bean *Canavalia gladiata* cv Shironata. *Plant Physiol.* 82, 795-800
- FUJIHARA, S. Und HARADA, Y. (1989) Fast growing root nodule bacteria produce a novel polyamine, aminobutylhomospermidine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165, 659-666
- FUJIHARA, S., ABE, H., MINAKAWA, Y., AKAO, S. und YONEYAMA, T. (1994) Polyamines in nodules from various plant-microbe symbiotic associations. *Plant Cell Physiol.* 35, 1127-1134
- FUJIHARA, S., ABE, H. und YONEYAMA, T. (1995) A new polyamine 4-aminobutylcadaverine. *J.Biol. Chem.* 270, 9932-9938
- GERNER, E. W., MAMONT, P. S., BERNHARDT, A. und SIAT, M. (1986) Posttranslational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D, by spermidine in rat hepatoma cells. *Biochem. J.* 239, 379-386
- GRASER, G. (1997) Die Rolle von Spermidin in der Biosynthese der Pyrrolizidin-Alkaloide: physiologische, enzymatische und mechanistische Aspekte. *Dissertation, TU Braunschweig*
- HAMANA, K., MATSUZAKI, S., NIITSU, M. und SAMEJIMA, K. (1992) Distribution of unusual polyamines in leguminous seeds. *Can. Journal of Botany, Vol. 70*, 1984-1990
- HAMANA, K., MATSUZAKI, S., NIITSU, M. und SAMEJIMA, K. (1994) Distribution of unusual polyamines in aquatic plants and gramineous seeds. *Can. Journal of Botany, Vol. 72*, 1114-1120
- HANAUSKE-ABEL, H. M., PARK, M. H., HANAUSKE, A.-R., POPOWICZ, A. M., LALANDE, M. und FOLK, J. E. (1994) Inhibition of the G1-S-transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1221, 115-124
- HANES, C. S. (1932) *Biochem. J.* 26: 1406-1421
- HARBORNE, J. B. (1993) Introduction to ecological Biochemistry 4th ed.; *Academic Press, London*
- HARTMANN, T. und TOPPEL, G. (1987) Senecionine-N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* 26: 1639-1643

- HARTMANN, T., SANDER, H., ADOLPH, R. D. und TOPPEL, G. (1988) Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta* 175: 182-190
- HARTMANN, T., EHMKE, A., EILERT, U., VON BORSTEL, K. und THEURING, C. (1989) Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid-N-oxides in *Senecio vulgaris*. *Planta* 177: 98-107
- HARTMANN, T. und WITTE, L. (1995) Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. (Pelletier, S. W., ed.), Vol. 9, Pergamon, Oxford: 155-233
- HARTMANN, T. (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomol. Exp. Et Appl.*
- HARTMANN, T. (1999) Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207: 483-495
- HARTMANN, T. und OBER, D. (2000) Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores. *Topics in Current Chemistry*, Vol. 209, Springer-Verlag, Heidelberg
- HASHIMOTO, T., TAMAKI, K., SUZUKI, K. und YAMADA, Y. (1998) Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant Cell Physiol.* 39, 73-79
- HASLAM, E. (1986) Secondary metabolism- facts and fiction. *Natural Products Reports* 3: 217-249
- HUSEK, P. , HUANG, Z. H: und SWEELY, C. C. (1992) Gas chromatographic determination of amines, aminoalcohols and acids after treatment with alkylchloroformates. *Anal. Chim. Acta* 259: 185-192
- INOUE, H. und MIZUTANI, A. (1973) A new method for isolation of polyamines from animal tissues. *Anal. Biochem.* 56: 408-416
- JOE, Y. A. und PARK, M. H. (1994) Structural Features of the eIF-5A Precursor Required for Posttranslational Synthesis of Deoxyhypusine. *Journal of Biological Chemistry* 269, 25916-25921
- JOE, Y. A., WOLFF, E. C. und PARK, M. H. (1995) Cloning and Expression of Human Deoxyhypusine cDNA. Structure-function studies with the recombinant Enzyme and Mutant Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 270, 22386-22392

- KAHN, H. A. und ROBINS, D. J. (1981a) Pyrrolizidine Alkaloids: Evidence for N-(4-Aminobutyl)-1,4-diaminobutane (Homospermidine) as an Intermediate in Retronecine Biosynthesis. *J. C. S. Chem. Comm.*, 554-556
- KAHN, H. A. und ROBINS, D. J. (1981b) Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: Incorporation of ^{13}C -Labelled precursors into retronecine. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 146-147
- KAHN, H. A. und ROBINS, D. J. (1985) Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: Synthesis of ^{14}C -labelled homospermidine and their incorporation into retrorsine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*: 819-824
- KAISER, F. E., GEHRKE, C. W., ZUMWALT, R. W. und KUO, K. C. (1974) Hydrolysis, ion-exchange cleanup, derivatization and quantitation by gass-liquid chromatography. *J. Chrom.* 94: 113-133
- KANG, H. A. und HERSHEY, W. B. (1994) Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 3934-3949
- KANG, K. R., WOLFF, E. C., PARK, M. H., FOLK, J. E. und CHUNG, S. I. (1995) Identification of *YHR068w* in *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome VIII as a Gene for Deoxyhypusine Synthase. Expression and Characterization of the Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 270, 18408-18412
- KIM, K. Y., HUNG, L. W., YOKOTA, H., KIM, R. und KIM, S.-H. (1998) Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1,8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10419-10427
- KLIER, H., CSONGA, R., STEINKASSERER, A., WÖHL, T., LOTTSPEICH, F. und EDER, J., (1995) Purification and characterization of human deoxyhypusine synthase from HeLa cells. *FEBS Letters* 364, 207-210
- KUTTAN, R., RADHAKRISHNAN, A. N., SPANDE, T. und WITKOP, B. (1971) *sym*-Homospermidine, a Naturally Occuring Polyamine. *Biochemistry, Vol. 10, No. 3*, 361-365
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680-685
- LIAO, D. I., WOLFF, E. C., PARK, M. H. und DAVIES, D. R. (1998) Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. *Structure* 6, 23-32
- LINEWEAVER, H. und BURK, D. (1934) The Determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.* 562, 658-666

- LUCKNER, M. (1990) Secondary metabolism in plants, microorganisms and animals. (3rd ed.). G. Fischer, Jena
- MAGDOLEN, V., KLIER, H., WÖHL, T., KLINK, F., HIRT, H., HAUBER, J. und LOTTSPREICH, F. (1994) The funktion of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Molecular and General Genetics* 244, 646-652
- MATTOCKS, A. R. (1986) Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. *Academic Press, London, New York*
- MATSUZAKI, S., HAMANA, K., IMAI, K. und MATSUURA, K. (1982) Occurrence in high concentrations of N¹-acetylspermidine and sym-homospermidine in the hamster epididymis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 107, 307-313
- MEHTA, A. M., SAFTNER, R. A., SCHAEFFER, G. W. und MATTOO, A. K. (1991) Translational Modification of an 18-Kilodalton Polypeptide by Spermidine in Rice Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 95, 1294-1297
- MEHTA, A. M., SAFTNER, R. A., MEHTA, R. A. und DAVIES, P. J. (1994) Identification of Posttranslationally Modified 18-Kilodalton Protein from Rice as Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A. *Plant Physiol.* 106, 1413-1419
- MOTHES, K. (1955) Physiology of alkaloids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6: 393-432
- MURASHIGE, T. und SKOOG, F. (1962) Medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- OBER, D. (1993) Reinigung der Homospermidinsynthase aus *Rhodopseudomonas viridis*. *Diplomarbeit, TU Braunschweig*
- OBER, D., THOLL, D., MARTIN, W. und HARTMANN, T. (1996) Homospermidine synthase of *Rhodopseudomonas viridis*: substrate specificity and effects of the heterologously expressed enzyme on polyamine metabolism of *E. coli*. *Arch. Microbiol.*
- OBER, D. (1997) Strategien zur immunologischen und molekularbiologischen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. *Dissertation, TU Braunschweig*
- OBER, D. und HARTMANN, T. (1999a) Deoxyhypusine Synthase from Tobacco. *Journal of Biological Chemistry* 274, No. 45, 32040-32047

- OBER, D. und HARTMANN, T. (1999b) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, No. 26, 14777-14782
- PARK, M. H. und WOLFF, E. C. (1988) Cell-free synthesis of Deoxyhypusine. Separation of Protein Substrate and Enzyme and Identification of 1,3-Diaminopropane as a Product of Spermidine Cleavage. *Journal of Biological Chemistry* 263 15264-15269
- PARK, M. H., COOPER, H. L. und FOLK, J. E. (1981) Identification of Hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2869-2873
- PARK, M. H., COOPER, H. L. und FOLK, J. E. (1982) The Biosynthesis of Protein-bound Hypusine (N`-(4-Amino-2-hydroxybutyl-)lysine). Lysine as the Amino Acid Precursor and the Intermediate Role of Deoxyhypusine (N`-(4-Aminobutyl)Lysine). *J. Biol. Chem.* 257, 7217-7222
- PARK, M. H., WOLFF, E. C., und FOLK, J. E. (1993a) Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors* 4, 95.104
- PARK, M. H., WOLFF, E. C., und FOLK, J. E. (1993b) Is Hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? *TIBS* 475-479
- PARK, M. H., JOE, Y. A., KANG, K. R., LEE, Y. B. und WOLFF, E. C. (1996) The polyamine-derived amino acid hypusine: Ist post-translational formation and ist role in cell proliferation. *Amino Acids* 10, 109-121
- PAY, A., HEBERLE-BORS, E. und HIRT, H. (1991) Isolation and sequence determination of the plant homologue of the eucaryotic initiation factor 4D cDNA from alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Molecular Biology* 17, 927-929
- REDMOND, L. W. und TSENG, A. (1979) High-pressure liquid chromatography determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chrom.* 170: 479-481
- SASAKI, K., ABID, M. R. und MIYAZAKI, M. (1996) Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 384, 151-154
- SCHNIER, J., SCHWELBERGER, H. G., SMIT-McBRIDE, Z., KANG, H. A. und HERSHEY, J. W. B. (1991) Translation Initiation Factor 5A and Its Hypusine Modification Are Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 11, 3105-3114

- SCHWELBERGER, H. G., KANG, H. A. und HERSHEY, J. W. B. (1993) Translation Initiation Factor eIF-5A Expressed from Either Two Yeast Genes or from Human cDNA. Functional Identity Under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Journal of Biological Chemistry* 268, 14018-14025
- SHIBA, T., MIZOTE, H., KANEKO, T., NAKAJIMA, T., KAKIMOTO, Y. und SANO, I. (1971) Hypusine, a new aminoacidoccurring in bovine brain. Isolation and structural determination. *Biochimica et Biophysica Acta* 244, 523-531
- SHIBA, T., AKIYAMA, H., UMEDA, I., OKADA, S. und WAKAMIYA, T. (1982) Synthesis and stereochemistry of hypusine, a new amino acid. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 55, 899-903
- SMITH, T. A. (1977) Homospermidine in *Rhizobium* and legume root nodules. *Phytochemistry* 16, 278-279
- SRIVENUGOPAL, K. S. und ADIGA, P. R. (1980) Enzymatic synthesis of sym-homospermidine in *Lathyrus sativus* (grass pea) seedling. *Biochem. J.* 190: 461-464
- STAHL, E., (1977) Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- SWAIN, T. (1977) Secondary compounds as protective agents. *Ann. Rev. Physiol.* 28: 479-501
- TAIT, G. H. (1979) The formation of homospermidine of an enzyme from *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochem. Soc. Trans.* 7: 199-200
- TAO, Y. und CHEN, K. Y. (1994) PCR-based cloning of the full-length *Neurospora* eukaryotic initiation factor 5A cDNA: polyhistidine-tagging and overexpression for protein affinity binding. *Biochemical Journal* 302, 517-526
- TAO, Y. und CHEN, K. Y. (1995a) Purification of Deoxyhypusine Synthase from *Neurospora crassa* to Homogeneity by Substrate Elution Affinity Chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 270, 383-386
- TAO, Y. und CHEN, K. Y. (1995b) Molecular Cloning and Functional Expression of *Neurospora* Deoxyhypusine Synthase cDNA and Identification of Yeast Deoxyhypusine Synthase cDNA. *Journal of Biological Chemistry* 270, 23984-23987
- TAO, Y., SKRENTA, H. M. und CHEN, K. Y. (1994) Deoxyhypusine Synthase Assay Based on the Use of Polyhistidine-Tagged Substrate and Metal Chelate-Affinity Chromatography. *Analytical Biochemistry* 221, 103-108

- THOLL, D. (1996) Reinigung, Klonierung und Expression in *Escherichia coli* der Homospermidinsynthase aus *Rhodopseudomonas viridis*. *Dissertation, TU Braunschweig*
- TICE, C. M. und GANEM, B., (1983a) Chemistry of Naturally Occuring Polyamines. 7. Selective Functionalization of Hydroxyputrescine. *J. Org. Chem.* 48, 5043-5048
- TICE, C. M. und GANEM, B., (1983b) Chemistry of Naturally Occuring Polyamines. 8. Total Synthesis of (+)-Hypusine. *J. Org. Chem.* 48, 5048-5050
- TOPPEL, G. (1987) Bildung von Pyrrolizidin-Alkaloid-N-Oxiden in Wurzel-organkulturen verschiedener *Senecio*-Arten und *Crotalaria scasselatii*-Keimpflanzen. *Dissertation, TU Braunschweig*
- TORRELIO, B. M., PAZ, M. A. und GALLOP, P. M. (1984) Cellular Proliferation and Hypusine Synthesis. *Experimental Cell Research* 154, 454-463
- WEHRLI, A. und KOVATS, E. (1955) Gaschromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen: Berechnung der Retentions-Indices aliphatischer, alicyclischer und aromatischer Verbindungen. *Helv. Chim. Acta* 42: 2709-2736
- WINK, M. (1987) Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Medica* 53: 509-582
- WOLFF, E. C., PARK, M. H. und FOLK, J. E. (1990) Cleavage of Spermidine as the First Step in Deoxyhypusine Synthesis. The Role of NAD⁺. *Journal of Biological Chemistry* 265, 4793-4799
- WOLFF, E. C., LEE, Y. B., CHUNG, S. I., FOLK, J. E. und PARK, M. H. (1995) Deoxyhypusine Synthase from Rat Testis: Purification and Characterization. *Journal of Biological Chemistry* 270, 8660-8666
- YAN, Y. P., TAO, Y. und CHEN, K. Y. (1996) Molecular cloning and functional expression of human deoxyhypusine cDNA based on expressed sequence tag information. *Biochem. J.* 315, 429-434

Lebenslauf

Name:	Reiner Harms	
Geburtsdatum:	10.04.1969	
Geburtsort:	Norden	
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Schulbildung:	08/1975 – 06/1981	Grundschule und Orientierungsstufe in Baltrum
	08/1981 – 05/1988	Ulrichsgymnasium in Norden
Abitur:	20.05.1988	
	06/1988–10/1988	Mitarbeit im elterlichen Vermietungsbetrieb auf Baltrum
Zivildienst:	11/1988–06/1990	im Nachbarschaftszentrum des Deutschen Kinderschutzbundes in Norden
	07-09/1990	Mitarbeit im elterlichen Vermietungsbetrieb auf Baltrum
Studium:	10/1990 – 05/1995	Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig
	02.09.1993	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
	23.05.1995	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Praktikum:	06/1995–11/1995	Apotheke der Krankenhäuser des Landkreises Hannover, Laatzen
	12/1995–05/1996	Sonnen-Apotheke, Hannover
Staatsexamen:	18.06.1996	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Approbation:	03.07.1996	
Vertretungstätigkeit in verschiedenen Apotheken:	07-08/1996	Neue Apotheke, Elze
	09/1996	Rats-Apotheke, Stolzenau
	10/1996	Linden-Apotheke, Ritterhude
	10/1996	Echtern-Apotheke, Stadthagen
	11/1996	Elefanten-Apotheke, Rinteln
	11–12/1996	Apotheke der Krankenhäuser des Landkreises Hannover, Laatzen
Weiterbildung:	01.01.1997	Beginn der praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Biologie im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. Hartmann ("Eigenschaften rekombinanter Desoxyhypusinsynthase und <i>sym</i> -Homospermidinsynthase aus <i>Senecio vernalis</i> ")
		01.01.1997 – 31.03.1999 wissenschaftliche Hilfskraft mit Abschluß
		seit 01.04.1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter
		Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik
Berufstätigkeit:	01.08.2001	Eintritt in die Bayer AG, Leverkusen, Geschäftsbereich Pharma OP Qualitätskontrolle als Laborleiter für Parenteralia

